

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

RÉACTIVITÉ ORGANOGÈNE DE BOURGEONS DE LAITUE (*LACTUCA SATIVA* L.)
EN CULTURE *IN VITRO* EN FONCTION DE FACTEURS GÉNÉTIQUES, CULTURAUX
ET HORMONAUX

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

PIERRE RAPHAËL DAVID

MAI 2013

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [a] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Tout au long de ma formation, j'ai eu la chance de côtoyer des gens qui m'ont transmis leur passion pour la nature et m'ont donné l'envie de poursuivre mes études dans ce domaine. Les circonstances de la vie m'ont destiné à poursuivre mes études à Montréal où j'achève en ce moment une maîtrise en sciences biologiques qui aborde la problématique du clonage *in vitro*. Loin d'avoir l'ambition de révolutionner le monde de la biologie végétale, mon intérêt est plutôt de solidifier mes connaissances dans le domaine de la propagation des végétaux. Je m'appête à affronter le marché du travail armé de belles expériences en régénération végétale, ainsi que d'une meilleure compréhension de la complexité du secteur agroenvironnemental.

Je tiens à remercier particulièrement Sylvie Laliberté (Ph.D.) et Sylvie Jenni (Ph.D.), codirectrices du mémoire, pour leur rôle central dans le succès de ma formation académique aux études supérieures. Elles ont commencé par accepter de m'encadrer en tant qu'étudiant malgré mes nombreuses lacunes et elles m'ont guidé avec beaucoup de patience tout au long de cette aventure commune. Leur soutien et leurs précieux conseils ont favorisé ma démarche de réflexion pour faire avancer ce fabuleux projet qui touche maintenant à sa fin.

Merci à M. Durant et Mme Vernet, qui m'ont insufflé mes premières notions approfondies en biologie au Lycée Alexandre Dumas. Mille mercis à Mario Cappadocia (Ph.D.) qui m'a introduit au monde de la culture *in vitro* à l'Institut de Recherche en Biologie Végétale de l'Université de Montréal (I.R.B.V.).

Au chapitre des remerciements, je tiens à reconnaître l'apport de Nicole Brassard (M.Sc.) qui m'a indiqué les pistes à explorer dans le cadre de ce projet, et celui de Jean-Claude Desrosiers, un technicien sénior hors pair qui m'a poussé à donner mon maximum. Je tiens également à saluer la contribution des autres membres de mon équipe du Centre de Recherche et de Développement en Horticulture Ornementale (C.R.D.H.) d'Agriculture et Agroalimentaire Canada, qui sont Luc Marchand (B.Sc.), Olbert Nicolas (M.Sc.) et Eleonor Trambly (M.Sc.). Je ne saurais oublier les membres de mon comité d'évaluation Denis Charlesbois (Ph.D.) et Sylvie Jenni (Ph.D.) du C.R.D.H., ainsi que Normand Chevrier (Ph.D.) et Sylvie Laliberté (Ph.D.) du département des sciences biologiques de l'UQAM.

Je tiens à souligner la contribution financière de la Coop-Uniforce et d'Haïti Jardin S.A. par l'entremise de contrats de travail et de bourses de formation.

Merci à mon frère Nicolas pour son aide dans ma vie de tous les jours pendant ma maîtrise. Merci également à ma sœur Betty, son mari David, leurs enfants (Mathis et Ema), ainsi qu'à mes proches qui m'ont encouragé (Suzanne, Sanjay, Tatiana, Laurent, Félicienne, Jihan, Mona, Coukie, Florence, Franklin, Kéfil, Réginald, Ivonne, Marjorie et Nadgèle pour ne citer que ceux-là).

Je termine cette page avec une pensée spéciale pour mes parents Pierre Richard David (Ing. Agr.) et Evelyne Bordes que je remercie de tout mon cœur pour leur soutien et leur amour inconditionnel, leur patience et « TOUT » le reste. Ils ont grandement contribué à la personne que je suis aujourd'hui.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	ix
LISTE DES TABLEAUX	xii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES	xiii
RÉSUMÉ	xix
INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
CHAPITRE I	
EFFET DU TYPE DE COUPE SUR LA RÉGÉNÉRATION IN VITRO DE LA LAITUE (LACTUCA SATIVA L. CV. ESTIVAL) À PARTIR DE BOURGEONS APICAUX ET AXILLAIRES	5
Résumé.....	5
1.1 Introduction.....	7
1.2 Matériel et méthodes.....	8
1.2.1 Matériel végétal	8
1.2.2 Prélèvement et aseptisation des explantats	8
1.2.3 Traitements	8
1.2.4 Milieu de culture	9
1.2.5 Acclimatation.....	9
1.2.6 Conditions environnementales dans la chambre de culture in vitro et d'acclimatation	9
1.2.7 Dispositif expérimental	10
1.2.8 Variables mesurées	10
1.2.9 Analyse statistique	11
1.3 Résultats.....	12
1.4 Discussion	17
1.4.1 Organogénèse induite en fonction des différents traitements de coupe	17
1.4.2 Organogénèse induite en fonction du type de bourgeon	19
1.4.3 Effets des composés phénoliques sur la régénération	20
1.5 Conclusion	22
1.6 Bibliographie.....	42

CHAPITRE II
EFFET DU CULTIVAR SUR LA RÉGÉNÉRATION IN VITRO DE LA LAITUE
(LACTUCA SATIVA L.) À PARTIR DE BOURGEONS APICAUX ET AXILLAIRES... 44

Résumé	44
2.1 Introduction	46
2.2 Matériel et méthodes	47
2.2.1 Matériel végétal	47
2.2.2 Prélèvement, aseptisation et excision des explantats	48
2.2.3 Milieu de culture	48
2.2.4 Acclimatation	49
2.2.5 Conditions environnementales dans la chambre de culture in vitro et d'acclimatation	49
2.2.6 Dispositif expérimental	49
2.2.7 Variables mesurées	50
2.2.8 Analyse statistique	51
2.3 Résultats	52
2.4 Discussion	57
2.5 Conclusion	59
2.6 Bibliographie	77

CHAPITRE III
RÉGÉNÉRATION IN VITRO DE BOURGEONS DE LAITUE (LACTUCA SATIVA L.)
EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES COMBINAISONS D'AIA ET DE BAP 79

Résumé	79
3.1 Introduction	80
3.2 Matériel et méthodes	81
3.2.1 Matériel végétal	81
3.2.2 Prélèvement, aseptisation et excision des explantats	81
3.2.3 Milieu de culture	82
3.2.4 Conditions environnementales dans la chambre de culture in vitro	82
3.2.5 Dispositif expérimental	82

3.2.6 Variables mesurées	82
3.2.7 Analyse statistique	84
3.3 Résultats.....	85
3.4 Discussion	89
3.4.1 Effets des hormones de croissance sur le développement racinaire	89
3.4.2 Effets des hormones de croissance sur le développement aérien	90
3.4.3 Effets des hormones de croissance sur certaines des autres variables prélevées.....	90
3.4.4 Effets du ratio auxine/cytokinine.....	91
3.5 Conclusion.....	93
3.6 Bibliographie	103
CHAPITRE IV	
EFFICACITÉ ASEPTISANTE DE L'HYPOCHLORITE DE SODIUM ET DU	
PEROXYDE D'HYDROGÈNE ET VIABILITÉ DE PLANTULES DE LAITUE	
(LACTUCA SATIVA L.) RÉGÉNÉRÉES IN VITRO À PARTIR DE BOURGEONS.....	
	105
Résumé	105
4.1 Introduction.....	107
4.2 Matériel et méthodes	109
4.2.1 Première expérience.....	109
4.2.1.1 Matériel végétal.....	109
4.2.1.2 Prélèvement, aseptisation et excision des explantats	109
4.2.1.3 Milieu de culture	109
4.2.1.4 Conditions environnementales dans la chambre de culture in vitro.....	110
4.2.1.5 Dispositif expérimental	110
4.2.1.6 Variables mesurées.....	110
4.2.1.7 Analyse statistique	111
4.2.2 Deuxième expérience.....	112
4.2.2.1 Matériel végétal.....	112
4.2.2.2 Prélèvement, aseptisation et excision des explantats	112
4.2.2.3 Milieu de culture et conditions environnementales dans la chambre de culture	
in vitro	112

4.2.2.4 Dispositif expérimental	112
4.2.2.5 Variables mesurées.....	113
4.2.2.6 Analyse statistique	114
4.3 Résultats.....	115
4.3.1 Première expérience.....	115
4.3.2 Deuxième expérience.....	116
4.4 Discussion	119
4.4.1 Première expérience.....	119
4.4.2 Deuxième expérience	120
4.5 Conclusion.....	122
4.6 Bibliographie.....	142
CHAPITRE V	
EFFET DE TRAITEMENTS ANTIOXYDANTS TELS QUE L'OBSCURITÉ, LE	
POLYVINYLPYRROLIDONE, L'ACIDE CITRIQUE ET L'ACIDE ASCORBIQUE	
SUR LA RÉGÉNÉRATION IN VITRO DE PLANTULES DE LAITUE (LACTUCA	
SATIVA L. CV. RAIDER)	
144	
Résumé.....	144
5.1 Introduction	146
5.2 Matériel et méthodes	148
5.2.1 Matériel végétal.....	148
5.2.2 Prélèvement, aseptisation et excision des explants	148
5.2.3 Milieux de culture.....	148
5.2.4 Traitements antioxydants.....	149
5.2.5 Conditions environnementales dans la chambre de culture in vitro	149
5.2.6 Dispositif expérimental	149
5.2.7 Variables mesurées	150
5.2.8 Analyse statistique	151
5.3 Résultats.....	152
5.4 Discussion	155
5.4.1 Effet de l'acide ascorbique et de l'acide citrique	155

5.4.2 Effet du PVP	156
5.4.3 Effet de l'obscurité	156
5.5 Conclusion.....	158
5.6 Bibliographie	177
CONCLUSION GÉNÉRALE.....	179
BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE	181
APPENDICE A	
ILLUSTRATION DES DIFFÉRENTES VOIES DE DÉVELOPPEMENT QUE PEUVENT PRENDRE LES EXPLANTATS	188

LISTE DES FIGURES

Figure	Page
1.1 Matériel végétal utilisé pour extraire les explantats issus de bourgeons apicaux et axillaires situés dans le cœur de la pomme de laitue.	32
1.2 Schéma des différents types de coupes des explantats : A) type diamant : DNT, B) type diamétral : DAL, C) type carré : CAR et D) type transversal : TRA. Photos d'explantats issus de bourgeons apicaux ayant subi les traitements de coupes correspondants (plus petite graduation = 1 mm).....	33
1.3 Régénération observée après 3 et 6 semaines de culture, (plus petite graduation = 1 mm).....	34
1.4 Analyse en composantes principales effectuée sur les variables mesurées pour le type de coupe	35
1.5 Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables pour chacune des coupes, en fonction de chacun des types de bourgeons (apicaux et axillaires) dont est issue la plantule, à la 3 ^e semaine <i>in vitro</i> . La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.	37
1.6 Nombre de feuilles produites par chaque plantule en fonction du type de coupe, selon le type de bourgeon (apical ou axillaire) dont est issue la plantule, à la 8 ^e semaine. Ce sont des données transformées ($\sqrt{}$). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.	38
1.7 Ratio; [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] pour chacune des coupes à la 6 ^e semaine <i>in vitro</i> , en fonction du type de bourgeon (apical ou axillaire) dont est issue la plantule. Ce sont des données transformées ($\sqrt{}$). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.	39
1.8 Indice d'opacité du milieu de culture à la 6 ^e semaine <i>in vitro</i> selon le type de bourgeon dont la plantule est issue. Ce paramètre est évalué sur une échelle allant de 0 à 5, 0 correspondant à l'absence de coloration et 5 à une forte coloration. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %	40
1.9 Longueur moyenne de la tige des plantules pour chacune des coupes à la 8 ^e semaine selon le type de bourgeon dont la plantule est issue. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %	41
2.1 Analyse en composantes principales effectuée sur les variables mesurées pour évaluer l'effet génotypique sur la régénération des explantats.	71
2.2 Longueur moyenne de la tige (distance entre le collet et la cime) des plantules viables (en cm) pour chacun des cultivars (Eldorado, Estival, Ithaca et Sunbelt)	

à la 8 ^e semaine. AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	73
2.3 Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules viables, pour chacun des cultivars (Eldorado, Estival, Ithaca et Sunbelt) et en fonction du type d'explantats après l'acclimatation (à la 8 ^e semaine). AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	74
2.4 Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules viables, pour chacun des cultivars (Eldorado, Estival, Ithaca et Sunbelt) et en fonction du type d'explantats à la 6 ^e semaine <i>in vitro</i> . AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	75
2.5 Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables, en réponse à l'exsudation de composés phénoliques par les plantules (0 = milieu clair, 5 = milieu très opaque), pour chacun des cultivars (Eldorado, Estival, Ithaca et Sunbelt) et en fonction du type d'explantats à la 6 ^e semaine <i>in vitro</i> . AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	76
3.1 Analyse en composantes principales effectuée sur les variables mesurées à la 6 ^e semaine en culture, pour évaluer l'effet des combinaisons d'hormones	98
3.2 Repère de ramification racinaire des plantules, calculé pour chacune des concentrations de BAP en fonction des concentrations d'AIA utilisées, après 6 semaines de culture. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	100
3.3 Indice d'opacité du milieu de culture, calculé pour chacune des concentrations de BAP en fonction des concentrations d'AIA utilisées, après 6 semaines de culture. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %	101
3.4 Ratio; [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable], calculé pour chacune des concentrations de BAP en fonction des concentrations d'AIA utilisées, après 6 semaines de culture. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	102
4.1 Représentation graphique du biplot illustrant la variation des variables sur les 2 axes principaux (F1 et F2) en fonction des traitements effectués pour l'aseptisation (1 ^{ère} expérience)	134
4.2 Analyse en composantes principales effectuée sur les variables mesurées après 6 semaines pour l'aseptisation (2 ^e expérience).	136
4.3 Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables, en fonction (A) du temps de stérilisation et (B) du pourcentage de NaOCl en solution. Ce sont des données arsin transformées. AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance	

à 95 %	138
4.4 Pourcentage de plantules mortes en fin d'expérience, en fonction (A) du temps de stérilisation et (B) du pourcentage de NaOCl en solution. AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La mortalité a été relevée sur le nombre initial de plantules viables. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	139
4.5 Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm), pour chaque type de bourgeon en fonction des durées d'aseptisation et des concentrations de NaOCl en solution (0.6 %, 1.2 % et 1.8 %). AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	140
4.6 Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm), en fonction (A) de la durée d'aseptisation et (B) du pourcentage de NaOCl. AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	141
5.1 Représentation graphique du biplot illustrant la variation des variables sur les 2 axes principaux (F1 et F2) en fonction des traitements effectués	170
5.2 Indice d'opacité du milieu de culture, en réponse à l'exsudation de composés phénoliques (0 = milieu clair, 5 = milieu très opaque), pour chacun des traitements (acide ascorbique et acide citrique, obscurité et PVP). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	172
5.3 Nombre moyen de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule, pour chacun des traitements (acide ascorbique et acide citrique, obscurité et PVP). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	173
5.4 Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm), pour chacun des traitements (acide ascorbique et acide citrique, obscurité et PVP). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %. Cette figure a été produite à partir des données transformées ($\sqrt{}$).....	174
5.5 Pourcentage de tubes contaminés, pour chacun des traitements (acide ascorbique et acide citrique, obscurité et PVP). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.....	175
5.6 Différence de croissance entre une plantule sur milieu avec phénols oxydés (à gauche) et une plantule sur milieu sans phénols (à droite)	176

LISTE DES TABLEAUX

Tableau	Page
1.1 Matrice de corrélation de Pearson (n-1).....	23
1.2 Anova à deux facteurs, type de coupe et type de bourgeon	30
2.1 Matrice de corrélation de Pearson (n-1).....	60
2.2 Anova à deux facteurs, cultivar et type de bourgeon	69
3.1 Matrice de corrélation de Pearson (n-1).....	94
3.2 Anova à deux facteurs, BAP et AIA	97
4.1 Combinaison des traitements de la première expérience	123
4.2 Tableau de corrélation des variables avec les axes F1 et F2 du biplot.....	125
4.3 Tableau présentant la contribution (%) de chacun des traitements aux axes F1 et F2 du biplot.....	127
4.4 Combinaisons des traitements de la deuxième expérience	129
4.5 Matrice de corrélation de Pearson pour la deuxième expérience.....	130
4.6 Anova des traitements d'aseptisation.....	133
5.1 Combinaisons des traitements.....	159
5.2 Tableau de corrélation des variables avec les axes F1 et F2 du biplot.....	161
5.3 Tableau présentant la contribution (%) de chacun des traitements aux axes F1 et F2 du biplot.....	163
5.4 Matrice de corrélation de Pearson (n-1).....	165
5.5 Anova du traitement antioxydant.....	168

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

AG	Coupe des explantats effectuée directement dans une solution d'acide ascorbique 0.1g/l et d'acide citrique 0.15g/l
AIA	Acide indole-acétique
AP	Explantat de laitue constitué d'un bourgeon apical et de tissus sous-jacents
AT	Coupe des tissus sous-jacents puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution d'acide ascorbique 0.1g/l et d'acide citrique 0.15g/l
AX	Explantat de laitue constitué d'un bourgeon axillaire et de tissus sous-jacents
BAP	6-benzylaminopurine
bflo6	Nombre de boutons floraux produits par les plantules à la 6 ^e semaine
bflo8	Nombre de boutons floraux produits par les plantules à la 8 ^e semaine
C1.5P1.5	Aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 1.5 %
C1.5P3	Aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %
C1.8P1.5	Aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 1.5 %
C1.8P3	Aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %
cal3	Diamètre maximal (mm) du cal à la base des tiges, à la 3 ^e semaine
cal6	Diamètre maximal (en mm) du cal à la base des tiges, à la 6 ^e semaine
calb3	Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 3 ^e semaine (0 = cal n'est pas de type brun et 1 = cal est de type brun)

calb6	Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 6 ^e semaine (0 = cal n'est pas de type brun et 1 = cal est de type brun).
calv3	Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 3 ^e semaine (0 = cal n'est pas de type vert et 1 = cal est de type vert)
calv6	Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 6 ^e semaine (0 = cal n'est pas de type vert et 1 = cal est de type vert)
CAR3	Coupe carrée de 3 mm de long
CAR6	Coupe carrée de 6 mm de long
CAR9	Coupe carrée de 9 mm de long
con3	Pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 3 ^e semaine (0 = absence de contamination et 1 = présence de contamination)
con6	Pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 6 ^e semaine (0 = absence de contamination et 1 = présence de contamination)
conb6	Pourcentage de contamination bactérienne dans le tube à la 6 ^e semaine (0 = absence de contamination bactérienne et 1 = présence de contamination bactérienne)
conf6	Pourcentage de contamination fongique dans le tube à la 6 ^e semaine (0 = absence de contamination fongique et 1 = présence de contamination fongique)
DAL3	Coupe diamétrale de 3 mm de long
DAL6	Coupe diamétrale de 6 mm de long
DAL9	Coupe diamétrale de 9 mm de long
dede3	Début du développement de l'explantat à la 3 ^e semaine (0 = absence de développement et 1 = présence d'un certain développement)
dede6	Début du développement de l'explantat à la 6 ^e semaine (0 = absence de développement et 1 = présence d'un certain développement)
DNT3	Coupe diamant de 3 mm de long
DNT6	Coupe diamant de 6 mm de long
DNT9	Coupe diamant de 9 mm de long
ELD	Cultivar de laitue Eldorado
EST	Cultivar de laitue Estival

exu6	Pourcentage de production d'exsudat à la 6 ^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat)
exupl6	Pourcentage de plantules viables montrant la présence d'exsudat à la base des tiges à la 6 ^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat)
fe3	Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 3 ^e semaine
fe6	Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6 ^e semaine
io3	Indice d'opacité du milieu de culture à la 3 ^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque)
io6	Indice d'opacité du milieu de culture à la 6 ^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque)
iopl3	Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 3 ^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque)
iopl6	Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6 ^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque)
ITH	Cultivar de laitue Ithaca
KDa	Kilodaltons, unité de mesure de la masse moléculaire
larb	Largeur (en mm) du bourgeon avant prélèvement (à sa base)
lgb	Longueur du bourgeon (en mm) avant prélèvement (du point d'insertion sur la tige du cœur de laitue jusqu'à son sommet)
lgra3	Somme des longueurs (en mm) de toutes les racines de la plantule à la 3 ^e semaine
lgra6	Somme des longueurs (en mm) de toutes les racines de la plantule à la 6 ^e semaine
lgti8	Longueur de la tige de la plantule (en cm) à la 8 ^e semaine (distance entre le collet et la cime)
lmra8	Longueur de la masse racinaire de la plantule (en cm) à la 8 ^e semaine (distance (en cm) entre le collet et 95 % de la masse racinaire)
M12.5	Coupe des explantats puis mise en culture sur un milieu contenant du PVP à 0.5 % (12.5 μ M)

M50	Coupe des explantats puis mise en culture sur un milieu contenant du PVP à 2 % (50 μ M).
mort3	Pourcentage de mortalité à la 3 ^e semaine (0 = vivant et 1 = mort). Le critère de mortalité a été appliqué à tous les types de développement et le pourcentage calculé par rapport au nombre initial d'explantats mis en culture
mort6	Pourcentage de mortalité à la 6 ^e semaine (0 = vivant et 1 = mort). Le critère de mortalité a été appliqué à tous les types de développement et le pourcentage calculé par rapport au nombre initial d'explantats mis en culture
mort8	Pourcentage de mortalité à la 8 ^e semaine (0 = vivant et 1 = mort). Le critère de mortalité a été appliqué à tous les types de développement et le pourcentage calculé par rapport au nombre initial d'explantats mis en culture
nofe3	Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 3 ^e semaine
nofe6	Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6 ^e semaine
nofe8	Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 8 ^e semaine
nora3	Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 3 ^e semaine
nora6	Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6 ^e semaine
OBS5	Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 5 jours
OBS7	Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 7 jours
OBS9	Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 9 jours
plgra3	Longueur (en mm) atteinte par la plus longue racine de la plantule à la 3 ^e semaine
plgra6	Longueur (en mm) atteinte par la plus longue racine de la plantule à la 6 ^e semaine
PT12.5	Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5 % (12.5 μ M)
PT50	Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 2 % (50 μ M)

PTM12.5	Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5 % (12.5 μ M), ensuite mise en culture sur un milieu contenant aussi du PVP à 0.5 % (12.5 μ M).
PTM50	Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 2 % (50 μ M), ensuite mise en culture sur un milieu contenant aussi du PVP à 2 % (50 μ M),
PVP	Polyvinylpyrrolidone
ra3	Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 3 ^e semaine
ra6	Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6 ^e semaine
ram3	Repère de ramification racinaire (0 = absence de ramification et 3 = très ramifié) à la 3 ^e semaine
ram6	Repère de ramification racinaire (0 = absence de ramification et 3 = très ramifié) à la 6 ^e semaine
ratioRF3	[nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 3 ^e semaine
ratioRF6	[nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6 ^e semaine
SUN	Cultivar de laitue Sunbelt
T10C0.6	Aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 10 minutes
T10C0.9	Aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.9 % pendant 10 minutes
T10C1.2	Aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 10 minutes
T10C1.5	Aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 minutes
T10C1.8	Aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes

T15C0.6	Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 15 minutes
T15C0.9	Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.9 % pendant 15 minutes
T15C1.2	Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 15 minutes
T15C1.5	Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 15 minutes
T15C1.8	Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 15 minutes
T5C0.6	Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 5 minutes
T5C1.2	Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 5 minutes
T5C1.8	Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 5 minutes
TEM	Témoin, explantat n'ayant subi aucun traitement
tfe3	Longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule à la 3 ^e semaine (distance entre le collet et la pointe de la plus longue feuille de la plantule)
tfe6	Longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule à la 6 ^e semaine (distance entre la zone d'insertion et la pointe de la plus longue feuille de la plantule)
TRA9	Coupe transversale de 9 mm de long
trt	Traitements
viab3	Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables à la 3 ^e semaine (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm)
viab6	Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables à la 6 ^e semaine (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm)
viab8	Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables à la 8 ^e semaine (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm)

RÉSUMÉ

La laitue (*Lactuca sativa* L.) est un légume-feuille de climat frais, ayant un cycle annuel. Son importance à la fois sociale et économique facilite la mise sur pied de programmes d'amélioration où les génotypes choisis sont préservés par clonage *in vitro*. Cette étude porte sur des facteurs d'ordres génétique, hormonal et cultural dans le but d'établir les conditions optimales pour la régénération des explantats, issus de bourgeons apicaux et axillaires, en plants de laitue producteurs de semences.

La première expérience (chap. 1) cherchait à optimiser le processus d'excision des tissus sous-jacents de l'explantat. Quatre types de coupes (diamant « DNT », carré « CAR », diamétral « DAL » et transversal « TRA ») ont été effectués, à différents niveaux (3, 6 et 9 mm), sur l'explantat. Les résultats ont montré que les explantats issus de bourgeons apicaux régénèrent mieux que ceux provenant des axillaires et que la coupe DNT6 a induit le meilleur pourcentage de régénération en plantules viables.

L'expérience suivante (chap. 2) étudie l'effet génétique du cultivar sur l'organogénèse. Pour ce faire, des explantats issus de bourgeons apicaux et axillaires ont été prélevés sur des cœurs provenant de 4 cultivars de laitue (*Lactuca sativa* L.) pommée (cvs. Estival, Ithaca, Eldorado) et romaine (cv. Sunbelt). Nous avons observé que les explantats issus de bourgeons apicaux sont encore ceux qui ont le mieux régénéré. De plus des différences génotypiques ont été décelées, bien que le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables n'ait pas été influencé par le cultivar.

La troisième expérience surveille l'effet de différentes combinaisons d'acide 3-indoleacétique (AIA) et de 6-benzylaminopurine (BAP) sur le développement et la viabilité des plantules de laitue pommée issues de bourgeons apicaux. Les résultats ont montré que l'AIA n'a pas affecté la régénération des plantules de laitue tandis que la BAP a négativement influencé chacune des variables à l'étude en dehors du nombre de feuilles. Nous avons déduit que la régénération peut se faire sur un milieu de culture contenant uniquement de l'AIA à une faible concentration.

Le problème lié à l'aseptisation en culture *in vitro* a été évoqué dans le chapitre 4. Une expérience exploratoire a permis de démontrer que l'aseptisation faite simplement avec de l'hypochlorite de sodium (NaOCl) donnait de meilleurs résultats qu'en combinaison avec du peroxyde d'hydrogène.

Une seconde expérience a été effectuée en utilisant différentes concentrations de NaOCl et durées d'exposition pour aseptiser des explantats issus de bourgeons apicaux et axillaires prélevés sur des cœurs de laitue pommée. Elle a révélé qu'une aseptisation faite avec du NaOCl à 1.2 % pendant 10 minutes donnait des résultats satisfaisants.

En dernier lieu, le brunissement des tissus et du milieu de culture, a été abordé au chapitre 5. Trois types de traitements antioxydants ont été utilisés, pour la première fois, sur des explantats de laitue issus de bourgeons axillaires : l'application d'une période à l'obscurité en début de culture (jours); le trempage et la coupe dans une solution d'acide citrique et d'acide ascorbique; le trempage dans une solution et/ou la mise en culture dans un milieu contenant du polyvinylpyrrolidone (PVP). Bien qu'il n'y ait pas eu de différence au niveau de l'indice d'opacité du milieu entre ces traitements, nous avons constaté que le fait de tailler l'explantat dans une goutte d'acide ascorbique et d'acide citrique est à considérer

puisque ce traitement est facile à appliquer en plus de favoriser le développement de feuilles (≥ 1 cm) et de racines (≥ 1 cm).

En somme, pour régénérer des explantats en plantules de laitue saines et viables provenant de n'importe quel cultivar, il faut utiliser les bourgeons apicaux comme explantats et les aseptiser avec du NaOCl 1.2% pendant 10 minutes. Puis, les tissus sous-jacents aux bourgeons doivent être excisés selon un plan de coupe DNT6, dans une goutte de solution antioxydante avant que les bourgeons soient placés sur un milieu de culture contenant uniquement de l'AIA.

MOTS CLÉS

Lactuca sativa L., culture *in vitro*, bourgeons apicaux et axillaires, taille des explantats, hormones de croissance, aseptisation, brunissement

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La laitue (*Lactuca sativa* L.) est cultivée dans plusieurs régions de climat frais du globe. Ce légume-feuille fait partie de la famille des Astéracées (Pink, 1991). Il existe sept groupes de laitues comestibles : la laitue pommée, romaine, beurre (ou Boston), à couper (ou laitue-feuille), grasse (ou Latine), tige (ou laitue-asperge), et à semence huileuse (Thicoïpé, 1997; Ryder, 1999). Ce légume a une grande importance à la fois économique et alimentaire.

Des recherches épidémiologiques portant sur la relation qui existe entre les habitudes alimentaires et les risques de maladies ont conclu que la nourriture a un impact sur la santé (Mulabagal *et al.*, 2010). La laitue est, consommée fraîche ou en salade mixte elle est considérée comme un aliment sain (Dupont *et al.*, 2000; Mulabagal *et al.*, 2010). En effet, une série d'études récentes ont démontré que plusieurs variétés de laitue contiennent des composées phénoliques ayant une activité antioxydante (Dupont *et al.*, 2000; Altunkaya et Gökmen, 2009; Mulabagal *et al.*, 2010). En plus des composés phénoliques, les qualités nutritionnelles de la laitue sont attribuées à la présence, dans les feuilles, de vitamines B et C, de caroténoïdes et de fibres (de Vries, 1997; Dupont *et al.*, 2000; Nicolle *et al.*, 2004; Altunkaya et Gökmen, 2009; Mulabagal *et al.*, 2010). La teneur varie en fonction de plusieurs facteurs tels que la variété, les conditions de croissance, la période de récolte, le type de traitement post-récolte et la durée d'entreposage (Dupont *et al.*, 2000; Nicolle *et al.*, 2004; Altunkaya et Gökmen, 2009; Mulabagal *et al.*, 2010). Les graines, riches en vitamines E, sont aussi exploitées pour leur teneur en huile, qui peut représenter jusqu'à 35 % de leur poids (de Vries, 1997). Dans la médecine traditionnelle, elles servent de traitement contre l'asthme et la toux en plus d'être utilisées comme analgésique (Mulabagal *et al.*, 2010).

La laitue est cultivée en rotation saisonnière avec d'autres cultures, principalement en champ sur tous les continents du globe (Thicoïpé, 1997; Ryder, 1999). Or ce type de production présente certaines difficultés pour les producteurs, par exemple au Québec les conditions de températures chaudes et humides de l'été favorisent la maturation des plants de laitue pommée en 45 et 55 jours et la fenêtre pour effectuer la récolte peut être aussi courte qu'un 1 jour (Jennie *et al.* 2006). Ces conditions de environnementale favorisent aussi la prolifération de maladie tel que la brûlure de pointes, la nervation brune et la pourriture (Jennie *et al.* 2006). Au moment de la récolte, certaines caractéristiques indésirable sont aussi surveillé tel que la formation de nervures proéminentes, la malformation et aussi les laitues

qui non pas atteint la maturité commerciale (Jenni *et al.* 2006). Les Européens et les Américains sont à la fois les plus grands producteurs et consommateurs de laitues. Aux États-Unis, la majorité de la production (2/3) se fait en Californie et en Arizona. En 2004, la production y a atteint 1.48 million de tonnes de tous types confondus sur une superficie de 324 000 hectares, ce qui représente un chiffre d'affaires de 2.1 milliards de dollars US (US Department of Agriculture, 2005). En 2008, 2 748 hectares ont été ensemencés en laitue au Québec, pour une production totale de 65 380 tonnes, ce qui représente une valeur à la ferme de 37.5 millions de dollars CAN (Morin et Shinder, 2009). La laitue Iceberg est la plus répandue sur le marché, en raison de son utilisation dans les restaurants à service rapide (Mulabagal *et al.*, 2010).

L'importance économique de la laitue encourage les décisionnaires à mettre sur pied des projets de recherche, ayant pour but d'améliorer la productivité qui fluctue en raison des effets néfastes du changement climatique, à savoir l'augmentation du taux d'humidité ou de sécheresse, respectivement favorables aux stress pathogénique et hydrique. Mais aussi aux périodes de gel, aux fortes concentrations de sels et même à la pollution, en faisant référence aux utilisations abusives de pesticides et d'engrais. Ainsi, les producteurs préfèrent un légume qui présente de bonnes caractéristiques horticoles, telles que la fermeté, le goût, la résistance aux maladies, le poids, la durée de conservation etc. Le but final étant d'offrir un produit de qualité après la récolte. L'amélioration génétique de la laitue fait partie de ces projets de recherche permettant de développer de nouvelles variétés mieux adaptées aux conditions biotiques et abiotiques des zones de production. Le processus qui mène à l'apparition de nouvelles variétés sur le marché passe par la préservation des génotypes qui performant bien au champ. A titre d'exemple nous pouvons citer les cultivars Hochelaga et Estival qui sont plus résistants qu'Ithaca, au Québec, pour la nervation brune ainsi que d'autres désordres physiologiques causés par la culture en condition de température élevée (Jenni et Emery 2008 ; Jenni et Emery 2009). Une façon efficace de conserver un génome c'est de le cloner *in vitro*.

En effet la laitue complète son cycle de vie en un an et l'évaluation des lignées doit être faite en champs, dans cette même année, pendant les saisons chaudes et humides de production, au moment où les désordres phytopathologiques et physiologiques apparaissent (Jenni *et al.* 2006) afin de sélectionner celles qui y résistent. Ces génotypes d'intérêt sont

ensuite clonés par culture *in vitro* et régénérés en plantules qui serviront soit pour les croisements, soit pour la production de semences qui seront utilisées l'année suivante pour être évaluées à leur tour. Actuellement des recherches portant sur la culture *in vitro* (Koevary *et al.*, 1978; Bloksberg et Salveit, 1986; Jenni *et al.*, 2006) et la génétique (Kim et Botella, 2004) de ce légume-feuille sont en cours pour augmenter la productivité.

En amélioration génétique, il faut s'assurer que les explantats sélectionnés soient en mesure de se régénérer en une plante complète (Ampomah-Dwamena *et al.*, 1997; Kanamoto *et al.*, 2006) libre de maladies virales, bactériennes ou fongiques. De plus pour obtenir une bonne organogénèse des tissus *in vitro*, qui entraînera une croissance adéquate de la plantule, plusieurs éléments sont à prendre en considération lors de la mise en tube tels que le génotype sélectionné, l'âge de l'explantat (Webb *et al.*, 1984), les conditions de croissance de la plante-mère (George, 1993), le niveau de stress occasionné au tissu lors de l'aseptisation ou de la manipulation, l'orientation du tissu dans le milieu (Garcia-Luis *et al.*, 2006), la durée et les conditions d'entreposage du matériel végétal avant la mise en culture (Jenni *et al.*, 2006). Et la liste continue même après la mise en tube, puisqu'il faut porter attention à la composition du milieu de culture (Teng *et al.*, 1992), la température, l'intensité de la lumière (Teng *et al.*, 1992), le type de contenant (Tisserat et Silman, 2000) et la quantité de CO₂ présent dans le contenant (Tisserat et Silman, 2000). Même l'interaction entre ces différents facteurs peut affecter la régénération. En somme, le succès de la culture *in vitro* dépend essentiellement de la capacité de régénération des génotypes sélectionnés (Ampomah-Dwamena *et al.*, 1997). Optimiser cette capacité est d'ailleurs l'un des plus grands défis de cette approche.

Malgré les nombreuses percées scientifiques, il est encore difficile de prévoir le comportement morphogénique des clones pendant l'étape de régénération. Parmi les obstacles à surmonter il existe la variation somaclonale, l'absence de régénération, le brunissement, la floraison prématurée des explantats, la prolifération anarchique de cal, la contamination, l'accumulation de composés phénoliques sous leurs formes oxydées dans le milieu et la non-synchronisation de l'étape d'acclimatation des plantules.

En ce qui concerne la culture *in vitro* de la laitue, nous retrouvons dans la littérature essentiellement des études dont l'objectif final était de se donner les outils nécessaires pour faire de la transformation ou de la micropropagation (Doerschug et Miller, 1967; Koevary *et*

al., 1978; Bloksberg et Salveit, 1986; Brown *et al.*, 1986; Ampomah-Dwamena *et al.*, 1997). Ce projet de recherche s'insère dans le cadre d'un programme d'amélioration génétique de la laitue où la priorité est mise sur la préservation de chacun des génotypes pour leur bagage génétique. C'est un des points les plus importants pour ce genre de projet, et la raison pour laquelle après l'étape *in vitro*, plusieurs mesures de sécurité et de précautions sont prises tant au niveau de l'identification, en passant par plusieurs étapes de vérification, qu'à celui des techniques utilisées. En effet les laitues sont clonées à partir de bourgeons apicaux dans l'unique but de prioriser la régénération directe des plantules, minimisant ainsi les risques de variation somaclonale (Bloksberg et Salveit, 1986) et la propagation des virus. Malgré cela, toutes les plantules régénérées subissent des tests Elisa afin d'identifier les plantules atteintes de maladie virale qui sont tout de suite détruites. De plus, à une étape plus avancée du processus de développement du cultivar, un nombre restreint de génotypes vont être séquencés dans le but de déceler toute anomalie dans le génome. C'est ainsi que notre étude se penche sur certains facteurs d'ordres génétique, hormonal et cultural dans le but de réduire, voire même d'éliminer les facteurs qui nuisent à la séquence des événements favorables à la régénération des explantats, issus de bourgeons apicaux et axillaires, en plantes productrices de semences. Cette recherche appliquée vise à perfectionner l'étape de clonage *in vitro* au sein d'un processus d'amélioration génétique déjà bien établi. Nous avons pris en considération les contraintes de temps, d'espace et de personnel de ce programme avant de la mettre sur pied, ce qui fait que la majorité des expériences ont été effectuées pour la première fois sur la laitue en général ou sur un cultivar en particulier.

CHAPITRE I

EFFET DU TYPE DE COUPE SUR LA RÉGÉNÉRATION *IN VITRO* DE LA LAITUE (*LACTUCA SATIVA* L. CV. ESTIVAL) À PARTIR DE BOURGEONS APICAUX ET AXILLAIRES

RÉSUMÉ

En amélioration génétique, la culture *in vitro* de laitue à partir de bourgeons apicaux et axillaires est utilisée pour assurer la préservation des lignées sélectionnées à chaque génération. Dans cette étude, 4 types de coupes (diamant, carré, diamétral et transversal) ont été effectués, à différents niveaux, sur les tissus sous-jacents aux bourgeons afin d'optimiser leur régénération en plantules viables (ayant au moins une feuille et une racine ≥ 1 cm). L'analyse de variables telles que le nombre de feuilles et de racines des plantules et l'exsudation de composés phénoliques dans le milieu a permis de démontrer la meilleure performance des explantats issus de bourgeons apicaux par rapport aux bourgeons axillaires, et cela indépendamment du type de coupe. Le pourcentage d'explantats issus de bourgeons apicaux ayant régénéré une plantule viable était plus élevé, de l'ordre de 29 % ($p < 0.0001$) après 6 semaines *in vitro*. Par ailleurs, pour les deux types de bourgeons confondus et après les 2 semaines d'acclimatation, la coupe diamant avec 6 mm de tissus sous-jacents au bourgeon a induit un pourcentage de régénération en plantules viables significativement plus élevé (80 %, $p < 0.0001$) que celui des coupes diamétrales (41 - 51 %, $p < 0.0001$) et transversales (49 %, $p < 0.0001$). Or pour cette même variable, les résultats obtenus pour la coupe diamant à 6 mm étaient comparables à ceux des coupes carrées (61 - 70 %, $p < 0.0001$) ainsi qu'à ceux des autres coupes de type diamant (71.3 - 76.3 %, $p < 0.0001$). Les coupes diamants CAR6 et DNT6 (83.8 - 83.8, $p < 0.0001$) avaient aussi un pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) plus élevé que les coupes DAL (5.1 - 5.0 - 4.9, $p < 0.001$) après l'acclimatation. De même les coupes CAR3, CAR6, DNT3, DNT6, DNT9 (70.0 - 71.3 - 72.5 - 82.5 - 80.0, $p < 0.0001$) avaient un pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) plus élevé que les coupes DAL6, DAL9 et TRA9 (35.0-31.3-45.0, $p < 0.0001$) à la 6^e

semaine *in vitro*. D'autre part, les 3 coupes de types CAR et DNT ainsi que la coupe DAL3 avaient un ratio nombre de racine (≥ 1 cm) / nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable, supérieur à celui des plantules issues des bourgeons axillaires des traitements de coupes de types DAL6 et DAL9.

MOTS CLÉS

Lactuca sativa L., culture *in vitro*, bourgeons apicaux et axillaires, préparation des explantats.

1.1 INTRODUCTION

Le clonage de la laitue à partir d'explantats formés de bourgeons apicaux ou axillaires permet non seulement de conserver les génotypes présentant des traits intéressants pour l'amélioration génétique, mais aussi de minimiser le risque d'obtenir des variants somaclonaux (Bloksberg et Salveit, 1986). La régénération se fait de façon directe, contrairement à la régénération indirecte obtenue à partir de disques foliaires (Koevary *et al.*, 1978) ou de cotylédons (Brown *et al.*, 1986; Hunter et Burritt, 2002) rapportée chez cette espèce. Indépendamment du type de régénération, l'organogénèse se produit selon un programme spécifique qui dépend d'une série de facteurs propres à la culture *in vitro*, mais aussi et surtout de l'état et de l'origine des tissus qui composent l'explantat (Teixeira da Silva, 2003). Koevary (1978), utilisant différentes parties de cœur de laitue en explantats, a mis en évidence que les bourgeons apicaux et les bourgeons axillaires allongés se régénèrent en plantules de laitue alors que les bourgeons axillaires dormants et les tissus parenchymateux de la moelle formaient des cals. De même, Jenni *et al.* (2006) ont pu régénérer des plantules de laitue à partir des deux types de bourgeons.

L'objectif de cette étude a été de comparer la réactivité *in vitro* de bourgeons apicaux et axillaires de laitue, préparés selon 4 types de coupes (diamétral, transversal, diamant et carré) effectuées à différents niveaux sur les tissus sous-jacents aux bourgeons, afin d'optimiser les conditions de régénération. Dix traitements de coupe ont permis de faire varier la masse, mais aussi la composition cellulaire des tissus sous-jacents aux bourgeons qui sont en contact avec le milieu nutritif. Ceci a permis de déterminer la combinaison type de coupe/type de bourgeon offrant le meilleur pourcentage de régénération des explantats en plantules viables.

1.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

1.2.1 Matériel végétal

Des pommes de laitue du cultivar Estival ont été récoltées le 28 août 2009, sur la Ferme Hotte et Van Winden (Napierville, Québec), au stade de maturité commerciale. Les cœurs ont été prélevés et entreposés à 2 °C pendant 3, 4, 5 et 6 jours, ce qui correspond respectivement aux répétitions 1, 2, 3 et 4, avant l'extraction des explantats pour la mise en culture *in vitro*.

1.2.2 Prélèvement et aseptisation des explantats

Les bourgeons apicaux et axillaires ainsi que les tissus sous-jacents, ont été extraits à l'aide d'un emporte-pièce en cuivre de 1 cm de large et 2.5 cm de long. Les explantats furent aseptisés par immersion avec agitation dans de l'hypochlorite de sodium à 0.6 %, à laquelle une goutte de Tween 80 (Fisher Scientific BP338-500) par 100 ml a été ajoutée, pendant 15 minutes. Ensuite, ils ont subi trois rinçages successifs de 5 minutes chacun dans de l'eau nanopure stérile (autoclavée pendant 20 minutes à 103.3 kPa et 121 °C).

1.2.3 Traitements

Avant la mise en culture, les explantats ont été taillés suivant dix traitements de coupes, sous hotte à flux laminaire. Cette étape avait pour but d'enlever les couches de tissus endommagés (fig.1.1 et 1.2). Les bourgeons apicaux et axillaires (facteur 1) ont été débarrassés de leurs feuilles dans un premier temps. Ensuite, les tissus sous-jacents aux bourgeons, provenant de la moelle du cœur de laitue, ont été soumis à quatre types de coupes conservant différentes longueurs de tissus, soit 10 combinaisons type de coupe/longueur (facteur 2) par type de bourgeon (apical et axillaire) pour un total de 20 traitements :

DNT 3, DNT 6, DNT 9 : coupes de type diamant respectivement de 3, 6 et 9 mm de long (fig.1.2.A).

DAL 3, DAL 6, DAL 9 : coupes de type diamétral de 3, 6 et 9 mm de long (fig.1.2.B).

CAR 3, CAR 6, CAR 9 : coupes de type carré de 3, 6 et 9 mm de long (fig.1.2.C).

TRA 9 : coupe de type transversal de 9 mm de long (fig.1.2.D).

1.2.4 Milieu de culture

Les explantats ont été mis en culture sur un milieu de base Murashige et Skoog (1962) renfermant du saccharose (30 g/l), de l'agar (8 g/l, de type Bacto, Sigma M9274) et $4.92 \mu\text{M}$ d'AIB (Sigma 15386-25G). Une fois le pH ajusté à 5.7, le milieu nutritif fut versé dans des tubes de 25 x 150 mm (12 ml/tube) scellés avec des bouchons Kim Kap et le tout stérilisé à l'autoclave à 103.3 kPa et 121 °C, pendant 20 minutes. Les explantats ont été insérés dans le milieu jusqu'à la base du bourgeon, immergeant ainsi tout le parenchyme sous-jacent à celui-ci. Aucun d'entre eux n'a été repiqué au cours de cette expérience. Ils ont été maintenus sur le même milieu pendant 6 semaines.

1.2.5. Acclimatation

Après la prise de données à la fin de la 6^e semaine *in vitro*, toutes les plantules qui n'étaient pas mortes ont été transférées en acclimatation pour une durée de 2 semaines. Elles ont été sorties des tubes et le reste de milieu adhérent aux racines a été délogé sous un filet d'eau du robinet. Les plantules sans racine ont été coupées à la base en dessous du collet. Puis la section coupée fut mise à tremper dans une solution d'AIB (Sigma i2886) à une concentration de $12.3 \mu\text{M}$ (2 500 ppm) pendant 15 secondes. Toutes les plantules, pourvues ou non de racines, ont été mises dans des plateaux de germination en plastique noir (28 cm de large par 54.6 cm de long), remplis de vermiculite (Vermiculite inc.) saturée d'eau. Ils ont été utilisés en triple épaisseur pour les rigidifier.

Une fois les plateaux remplis de plantules (4 rangées x 9 plantules par rangée = 36 plantules maximum par plateau), ils ont été recouverts d'un dôme non ventilé. Ils ont ensuite été placés à quatre par tablette dans une autre chambre à environnement contrôlé. Après une semaine les dômes non ventilés ont été remplacés par d'autres qui ont préalablement été perforés de trois ouvertures de 7 cm de largeur par 4 cm de hauteur chacune. La dernière prise de données a eu lieu à la fin des deux semaines de l'étape d'acclimatation.

1.2.6 Conditions environnementales dans la chambre de culture *in vitro* et d'acclimatation

La température moyenne était de 12 °C la nuit et 16 °C le jour. La photopériode de 16 heures à $80 \mu\text{mol/m}^2$ a été assurée par des néons de 48", 40 W (F40/ agro de Philips, Wesco, Saint-Jean-sur-Richelieu).

1.2.7 Dispositif expérimental

L'expérience a été conçue sous forme de plan factoriel complet. Ce dernier comprend 2 facteurs et 4 blocs répétitifs, à raison d'un bloc par jour. Chacun des blocs compte 200 individus qui représentent chacun un essai. Les explantats ont été répartis de façon aléatoire dans les blocs. Le bilan des traitements est le suivant :

10 coupes x 2 bourgeons x 10 tubes par traitement (unité expérimentale) = 200 tubes par répétition x 4 = 800 tubes ou explantats.

Au total, 400 cœurs de laitue ont été utilisés pour le prélèvement des explantats.

1.2.8 Variables mesurées

Afin de comparer les différents traitements, un certain nombre de variables quantitatives et qualitatives ont été relevées à trois périodes différentes. La première prise de données a eu lieu à la fin de la 3^e semaine *in vitro*, la seconde à la fin de la 6^e semaine *in vitro*, soit juste avant le début de l'acclimatation et la dernière à la fin de la 8^e semaine, soit après deux semaines d'acclimatation (les chiffres des codes réfèrent à la semaine de culture pendant laquelle le relevé a été effectué). Les variables qualitatives ont été évaluées comme l'absence (0) ou la présence (1) du phénomène indiqué, permettant d'en déduire un pourcentage, ou son ampleur (0 à 5) (cf. liste des abréviations).

Les variables quantitatives comprenaient : nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites (nofe3, nofe6, nofe8), nombre de racines (≥ 1 cm) produites (nora3, nora6), diamètre maximal du cal à la base des tiges (cal3, cal6, en mm), nombre de boutons floraux (bflo3, bflo6, bflo8), longueur de la tige de la plantule (lgti8, en cm), pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges (calb3, calb6), pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges (calv3, calv6), pourcentage de mortalité (mort3), pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube (con3, con6), pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (viab3, viab6, viab8 : 0 = absence de feuille et/ou de racine ≥ 1 cm et 1 = présence d'au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) (fe3 et fe6); pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) (ra3 et ra6);

[nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] (ratioRF3 et ratioRF6).

Les variables qualitatives comprenaient : repère de ramification racinaire (ram6 : 0 = absence de ramification et 3 = système racinaire très ramifié), indice d'opacité du milieu de culture (io3, io6 : 0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque), et indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) (iop13 et iop16).

Les pourcentages de mortalité, de contamination, de régénération en plantules viables, d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) et d'au moins une racine (≥ 1 cm), ainsi que l'indice d'opacité du milieu de culture, ont été relevés sur l'ensemble des tubes et calculés par rapport au nombre initial d'explantats mis en culture. Les autres variables ont été relevées sur les plantules viables régénérées et leurs pourcentages établis par rapport à ces dernières.

1.2.9 Analyse statistique

Dans un premier temps, une analyse en composantes principales (ACP) a été faite en utilisant le logiciel de traitement de données XLSTAT (Addinsoft, 2007), afin d'identifier les variables corrélées entre elles (Analyse du coefficient de corrélation de Pearson) et de sélectionner, parmi les variables mesurées pour le type de coupe, un sous-ensemble de variables pour les analyses subséquentes.

Par la suite, une analyse de variance a été effectuée, en utilisant la procédure GLM (SAS Institute Inc, 1999), permettant ainsi la mise en évidence des différences significatives entre les traitements type de coupe, type de bourgeon et leurs interactions. Les différences significatives entre les effets ont été identifiées à l'aide du test de Tukey.

Le modèle linéaire a été ajusté, pour chacune des répétitions, en faisant la moyenne des variables numériques et le pourcentage des variables binaires. Au besoin, certaines données ont été transformées, par la fonction racine carrée et logarithmique, pour satisfaire à l'homogénéité de variances, ainsi qu'à l'homoscédasticité et la normalité de distribution des résidus. Ces valeurs ont été représentées graphiquement à l'aide de barres représentant 95 % de l'intervalle de confiance.

1.3 RÉSULTATS

Aucune différence significative n'a été observée entre les quatre répétitions.

L'ACP (fig. 1.4) sert à identifier la redondance dans le jeu de données à l'aide des deux composantes principales (F1 et F2) qui expliquent 70.20 % de la variabilité ($p < 0.001$) des paramètres à l'étude. Des corrélations significatives ont été mises en évidence et peuvent être visualisées sur l'ACP par les angles aigus entre les vecteurs des variables. Plus l'angle est petit, plus les variables sont corrélées.

À l'égard de l'état de santé des plantules (tabl. 1.1), le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables 'viab8' était fortement et positivement corrélé aux pourcentages observés à la 3^e semaine 'viab3' ($r = 0.82****$) et à la 6^e semaine 'viab6' ($r = 0.92****$). D'autre part, 'viab8' était négativement corrélé au pourcentage de mortalité à la 3^e, 6^e et 8^e semaine, respectivement 'mort3' ($r = -0.32**$), 'mort6' ($r = -0.68****$) et 'mort8' ($r = -0.92****$) d'une part et de l'autre au pourcentage de contamination des explantats à la 3^e et la 6^e semaine 'con3' ($r = -0.45****$) et 'con6' ($r = -0.51****$). Le pourcentage de régénération en plantules viables étant très important pour ce projet, ces trois variables ont été préservées pour l'analyse subséquente.

Pour ce qui est des variables mesurées sur les feuilles (tabl. 1.1), le nombre de feuilles 'nofe8' était fortement et positivement corrélé au nombre de feuilles produites par les plantules et au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 3^e et 6^e semaines, respectivement 'nofe3' ($r = 0.88****$), 'nofe6' ($r = 0.94****$), 'fe3' ($r = 0.81****$) et 'fe6' ($r = 0.66****$) et négativement corrélé au pourcentage de cal de type vert à la 6^e semaine ($r = -0.25*$). La variable 'nofe8' a été préservée pour l'analyse subséquente afin de quantifier la régénération foliaire des plantules. D'autre part la variable 'fe6' a été préservée pour identifier les traitements favorisant une plus forte organogénèse foliaire chez les explantats.

Parmi les variables caractérisant les racines (tabl. 1.1), le nombre de racine après 6 semaines 'nora6' était fortement corrélé au nombre de racines produites par les plantules 'nora3' ($r = 0.80****$) et au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) 'ra3' ($r = 0.82****$) à la 3^e semaine, au repère de ramification racinaire 'ram6' ($r = 0.61****$) et au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule

pourvue d'au moins une racine ($\geq 1\text{cm}$) 'ra6' ($r = 0.79^{****}$) à la 6^e semaine, à la longueur de la masse racinaire à la 8^e semaine 'lmra8' ($r = 0.65^{****}$) ainsi qu'au ratio nombre total de racines/nombre total de feuilles produites par plantule viable à la 3^e et la 6^e semaine respectivement 'ratioRF3' ($r = 0.31^{**}$) et 'ratioRF6' ($r = 0.35^{***}$)

De plus, 'nora6' était fortement et positivement corrélé à plusieurs variables associées au cal, soit le diamètre maximal du cal ainsi que le pourcentage de cal de type vert à la 3^e semaine, respectivement 'cal3' ($r = 0.53^{****}$) et 'calv3' ($r = 0.55^{****}$), et au diamètre maximal du cal 'cal6' ($r = 0.41^{***}$), au pourcentage de cal de type brun 'calb6' ($r = 0.55^{****}$) et vert à la 6^e semaine. 'nora6' était toutefois faiblement et négativement corrélé au pourcentage de cal de type vert à la 6^e semaine 'calv6' ($r = -0.26^*$).

La variable 'nora6' a été utilisée comme variable représentative de la croissance racinaire de la plante parce que c'est à ce moment que l'ont pouvait encore compter le nombre de racines avant la mise en vermiculite. La variable 'ra6' a été préservée pour identifier les traitements favorisant une plus forte organogénèse racinaire chez les explantats. Le 'ratioRF6' a été conservé pour quantifier la proportion de racines par rapport au nombre de feuilles au moment de l'acclimatation chez les plantules de laitue viables.

La longueur de la tige 'lgti8' était très corrélée avec le nombre de boutons floraux à la 6^e (bflo6, $r = 0.43^{****}$) et la 8^e (bflo8, $r = 0.63^{****}$) semaines. La variable 'lgti8' a été conservée pour donner une idée de l'effet des traitements sur la croissance des plantules.

En dernier lieu, l'indice d'opacité du milieu de culture 'io6' à la 6^e semaine était fortement et positivement corrélé à ce même indice à la 3^e semaine 'io3' ($r = 0.82^{****}$) à l'indice d'opacité du milieu des plantules viables à la 3^e et la 6^e semaine 'iop13' ($r = 0.69^{****}$), 'iop16' ($r = 0.75^{****}$) ainsi qu'au pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges des plantules à la 3^e semaine 'calb3' ($r = 0.42^{***}$).

Les regroupements ci-dessus ont permis d'identifier la variable la plus représentative parmi celles qui sont corrélées entre elles, ce qui a grandement facilité les analyses statistiques et l'interprétation des données. Lors de la sélection nous avons priorisé, dans un premier temps, les variables quantitatives. Ensuite, les paramètres faisant référence à des organes différents ont été sélectionnés pour enrichir l'analyse globale de l'expérience (nora6, nofe6 et nofe8, lgti8). Certaines variables ont été préservées bien qu'elles étaient corrélées à une autre, pour montrer l'évolution dans le temps de certains paramètres (viab3, vaib6,

viab8). Les autres ont simplement été mises de côté pour éviter la redondance de l'information. Après ce tri, dix variables ont été retenues pour les analyses de variances, il s'agit de fe6, nofe8, ra6, nora6, ratioRF6, io6, lgti8, viab3, viab6, viab8.

L'interaction (tabl.1.2) entre le type de coupe et le type de bourgeon ayant servi à former l'explantat était significative chez cinq des variables retenues; il s'agit du pourcentage de plantules viables à la 3^e semaine (viab3, $p < 0.05$), de l'indice d'opacité du milieu de culture (io6, $p < 0.01$), du ratio du nombre de racines sur le nombre de feuilles produites par plantule viable (ratioRF6, $p < 0.05$) à la 6^e semaine d'une part et du nombre de feuilles (≥ 1 cm) (nofe8, $p < 0.001$), ainsi que la longueur moyenne de la tige des plantules viables à la 8^e semaine (lgti8, $p < 0.001$) d'autre part. Les autres variables retenues, à savoir le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) (fe6), le nombre de racines (≥ 1 cm) (nora6), le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) (ra6) et le pourcentage d'explantats ayant régénéré des plantules viables (viab6), à la 6^e semaine et (viab8) à la 8^e semaine, ne présentaient pas d'interactions significatives (tabl.1.2). Les effets principaux ont alors été utilisés pour comparer les résultats de ces variables.

Indépendamment du type de coupe, les plantules issues de bourgeons apicaux ont produit 2.5 fois plus de feuilles ($p < 0.0001$), 1.8 fois plus de racines ($p < 0.0001$), une tige plus longue de 1.7 fois ($p < 0.0001$), et un indice d'opacité du milieu plus élevé ($P < 0.05$). De plus, 91.3% ($p < 0.0001$) des explantats issus des bourgeons apicaux avaient régénéré des plantules pourvues d'au moins une feuille (≥ 1 cm) et 76.5 % ($p < 0.0001$) au moins une racine (≥ 1 cm), alors que pour celles issues des axillaires les pourcentages étaient de 62.0% ($p < 0.0001$) et 44.8 % ($p < 0.0001$) respectivement. Par contre le ratio nombre de racines sur nombre de feuilles produites par plantule viable à 6 semaines était 0.9 fois plus élevé chez les plantules viables issues des bourgeons axillaires que chez celles issues des bourgeons apicaux. Au final, 75.3 % des bourgeons apicaux ont régénéré des plantules viables, un pourcentage supérieur de 29 % à celui des bourgeons axillaires ($p < 0.0001$, tabl.1.2).

Après 3 semaines de culture, le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables était plus élevé (fig.1.5) chez ceux formés à partir de bourgeons apicaux et ayant subi des coupes de type diamant que chez les coupes transversales TRA et diamétrales DAL6 et DAL9, sans toutefois être significativement différent de celui des coupes carrées (CAR3,

CAR6, CAR9). Quant à ceux provenant des bourgeons axillaires, la coupe DNT3 a favorisé une meilleure régénération que les coupes DAL6 et DAL9. A cette même prise de données, le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables est plus élevé chez les plantules issues de bourgeons apicaux comparativement à celles issues des bourgeons axillaires.

Pour les deux types de bourgeons confondus (tabl.1.2), après 6 semaines, le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables était significativement plus élevé chez les 3 coupes DNT comparativement aux 3 coupes DAL et la coupe TRA9. Après les deux semaines d'acclimatation, le pourcentage de régénération était plus élevé avec le traitement DNT6 qu'avec les traitements DAL et TRA.

Après l'acclimatation (fig.1.6), les plantules provenant des bourgeons apicaux et ayant subi le traitement DNT3, avaient produit moins de feuilles que les traitements de coupes DAL3 et DAL6. En ce qui concerne les plantules régénérées à partir d'explantats axillaires, les traitements de coupes DAL6 et DAL9 avaient produit un nombre de feuilles inférieur à celui des plantules issues des traitements de coupes CAR9, DNT3 et TRA9.

L'analyse du pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (>1 cm) à la 6^e semaine *in vitro* (tabl.1.2) a montré que les traitements de coupes CAR6 et DNT6 avaient des pourcentages plus élevés que le traitement de coupe TRA9 ($p < 0.05$), alors que les autres traitements ne différaient pas.

Le type de coupe affectait ($p < 0.0001$) le nombre de racines après 6 semaines de culture (tabl.1.1). En effet, les plantules émanant des explantats ayant subi les 3 coupes de types diamant et carré ont développé plus de racines (≥ 1 cm) que celles des coupes DAL6 et DAL9. Seules les plantules provenant des traitements CAR3 et DNT3 ont produit significativement plus de racines que celles issues des 3 coupes de type DAL et TRA9. Toujours à la 6^e semaine *in vitro*, le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) était plus élevé chez celles issues des traitements DNT6 et DNT9 comparativement à celles provenant des 3 coupes de types DAL et de la coupe TRA9. Ce pourcentage était plus élevé chez les 3 coupes de types CAR et DNT, en comparaison aux traitements de coupes de type DAL3, DAL6, DAL9 et TRA9.

Le ratio entre le nombre de racines (≥ 1 cm) / le nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable (fig.1.7) issues de chacune des coupes était comparable entre les types de bourgeons, à la 6^e semaine *in vitro*, sauf pour la coupe de type CAR3 chez qui ce

ratio était plus élevé pour celles issues des bourgeons axillaires. En ce qui concerne les plantules viables régénérées à partir des bourgeons apicaux, ce ratio était plus élevé chez les coupes de type DNT3 comparativement à DAL3, DAL6 et DAL9. D'autre part, les plantules issues de bourgeons axillaires et des 3 coupes de types CAR et DNT ainsi que les coupes DAL3 et TRA9 avaient un ratio supérieur à celui des traitements de coupes de type DAL6 et DAL9, des plantules issues de ce même bourgeon. Chez les plantules viables issues des bourgeons apicaux, seules celles provenant de la coupe de type DNT3 avaient un ratio supérieur à celles provenant de ce même type de bourgeon et des coupes de types DAL6 et DAL9.

L'indice d'opacité du milieu, après 6 semaines (fig.1.8), chez les plantules issues de bourgeons apicaux ne différait pas entre les coupes DAL et TRA9, mais ces plantules avaient un milieu de culture plus opaque que toutes celles provenant des autres traitements, à savoir carré et diamant. En ce qui concerne les tubes ayant des bourgeons axillaires, DAL3 avait un milieu plus opaque que celui des plantules issues des traitements CAR, DNT3 et DNT6 mais ne différait pas de DNT9, DAL6, DAL9 et TRA9. Par ailleurs, les traitements DAL6 et DAL9 étaient les seuls pour qui l'indice d'opacité du milieu différait entre les explantats apicaux et axillaires.

En ce qui concerne la longueur de la tige, les traitements CAR3, CAR6, DAL3, DAL6 et DAL9 (tabl.1.1) ont produit des plantules ayant une tige plus longue chez celles issues des bourgeons apicaux, comparativement à celles issues des traitements des bourgeons axillaires (fig.1.9). Indépendamment du type de coupes, la longueur de tige ne différait pas entre les plantules issues de bourgeons apicaux. Chez celles provenant des bourgeons axillaires, la coupe CAR9 a produit des plantules ayant une tige plus longue que celle régénérée à partir des coupes CAR3, CAR6, les 3 coupes de DAL et la coupe TRA9. De plus, la tige des plantules provenant toujours des bourgeons axillaires et des 3 traitements de coupes de types DNT était plus longue que celle des 3 traitements de coupe de type DAL.

1.4 DISCUSSION

1.4.1 Organogénèse induite en fonction des différents traitements de coupe

Warren Wilson *et al.* (1994) ont utilisé du tissu prélevé à différentes hauteurs au niveau de la moelle indifférenciée pour étudier la division et la différenciation cellulaires en éléments conducteurs du xylème chez la laitue. Ce tissu se compose de grandes cellules parenchymateuses uniformément réparties, avec une capacité remarquable à former du xylème en présence d'éléments nutritifs et d'auxine (AIA). Dans le présent projet, c'est dans ce même tissu, situé juste sous le bourgeon, que les traitements de coupes ont été appliqués. C'est aussi cette portion de l'explantat qui a été insérée dans le milieu nutritif, et qui a donné lieu à la formation de cals et/ou de racines. Les explantats ayant subi les coupes de type DAL et TRA conservaient un plus grand volume de ce type de tissu au moment de la mise en culture comparativement à ceux des coupes de types CAR et DNT.

Les mécanismes contrôlant la division cellulaire ainsi que la disposition spatiale des tissus ne sont pas bien connus. Laurence et Robyn (2005) ont démontré que le niveau d'échanges intercellulaires est élevé avant le début de l'organogénèse indirecte à partir d'assises cellulaires minces chez *Torenia*, puisque la limite d'exclusion de base passe de 799 daltons (Da) à un intervalle compris entre 10 et 40 kDa après quatre jours en culture. Cette augmentation considérable de l'unité de mesure des macromolécules impliquées dans les échanges symplastiques entre les cellules rappelle le rôle important des plasmodemes dans l'organogénèse des tissus en culture (Kim *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2005). Une étude sur la régénération indirecte de *Gerbera jamesonii* a démontré que les explantats massifs sont parfois plus faciles à régénérer que les petits (Nhut *et al.*, 2007). Le fait que les explantats de grande taille présentent une plus grande surface de contact avec le milieu de culture leur procure une plus grande zone d'échanges lors de la translocation d'éléments nutritifs (Nhut *et al.*, 2007) et de messages chimiques, essentiels au développement. Nos résultats convergent avec ceux de ces auteurs dans la mesure où les explantats issus de bourgeons apicaux, outre le fait d'être plus gros, se sont mieux régénérés que ceux issus de bourgeons axillaires. Toutefois indépendamment du type de bourgeons, les traitements DAL et TRA, bien qu'ayant produit les explantats les plus massifs, ont induit une moins bonne régénération que les traitements DNT6. Les expériences de Warren Wilson *et al.* (1994) sur la moelle de la

laitue suggèrent que la formation de cal et de xylème est plus efficace au niveau de la zone de contact entre le tissu et le milieu qui contient l'hormone de croissance, à cause d'un mouvement limité de l'auxine en fonction de la distance à parcourir. On pourrait suggérer que l'AIB absorbé par les explantats ayant subi des coupes DAL et TRA n'arrive pas à initier la croissance du bourgeon en plantule aussi efficacement que chez DNT et CAR, en raison d'une plus grande distance à parcourir entre les tissus insérés dans le milieu et le bourgeon avec ce type de coupe.

Il est également nécessaire de prendre en considération l'emplacement des différents tissus qui composent l'explantat parce qu'il peut avoir un effet sur leur réponse morphogénique. Ainsi chez *Gerbera jamesonii*, les assises cellulaires minces prélevées dans la zone médiane du réceptacle floral ont présenté un meilleur potentiel d'organogénèse indirecte que les strates externes (Nhut *et al.*, 2007). Dans notre projet, indépendamment du type d'explantat, les coupes de types CAR et DNT ont été faites de manière à exhiber la région médiane de la moelle. Une fois insérés dans le milieu nutritif, ce sont ces tissus internes qui assurent les échanges avec le milieu de culture. Par contre pour les traitements de coupes DAL et TRA, ce sont les régions périphériques qui ont été exposées au substrat. Or, le traitement DNT6 a montré le plus grand pourcentage (80 %, $p < 0.0001$) d'explantats régénérés en plantules viables après l'étape d'acclimatation, sans être significativement différent des traitements CAR, DNT3 et DNT9. Le suivi dans le temps de ce paramètre démontre que le pourcentage de plantules viables des coupes DAL et TRA est inférieur à celui des coupes DNT6 et DNT9 à la 3^e et la 6^e semaines *in vitro*. Une explication possible à cette observation serait que les couches externes (non excisées) qui assurent l'absorption des nutriments chez les coupes DAL et TRA sont aussi celles qui ont subi le stress de l'aseptisation à l'hypochlorite de sodium. Sachant que le niveau de dommage causé à l'explantat lors de la préparation pour la mise en tube peut faire diminuer le potentiel organogène du tissu (Nhut *et al.*, 2007), nous pouvons émettre l'hypothèse que les coupes DAL et TRA aient eu une quantité limitée de tissu sain en contact avec le milieu pour effectuer les échanges.

En ce qui concerne le ratio du nombre de racines sur le nombre de feuilles, produites par plantule viable, à la fin de la 6^e semaine, soit juste avant l'étape d'acclimatation, il était en moyenne de 2.8, 2.6, 1.6 et 1.1, respectivement pour les coupes DNT, CAR, TRA et DAL

indépendamment du type de bourgeon. De plus l'analyse des interactions a montré que les plantules issues des bourgeons axillaires et des 3 coupes de types CAR et DNT ainsi que de la coupe DAL3 avaient un ratio supérieur à celui des plantules issues des bourgeons axillaires des traitements de coupes de types DAL6 et DAL9. Ces ratios plus élevés pour les coupes DNT et CAR nous indiquent que le nombre de racines était pratiquement le double de celui des feuilles pour ces traitements, alors qu'ils étaient presque à égalité pour les deux autres traitements DAL6 et DAL9. Par ailleurs le pourcentage de régénération en plantules viables était parmi les plus faibles chez les coupes DAL et TRA en fin d'acclimatation, une étape cruciale pour la mise en marche des stomates encore non fonctionnels. Ceci pourrait être expliqué par une plus grande perte par évapotranspiration dans les traitements ayant un ratio nombre de racines sur nombre de feuilles, produites par plantule viable, plus faible.

1.4.2 Organogénèse induite en fonction du type de bourgeon

Chez l'avocat (*Persea americana* Mill.), des différences de réactivité entre les explantats issus de bourgeons apicaux et axillaires ont été identifiées. En effet, les bourgeons axillaires ont produit des plantules ayant des tiges plus courtes et en plus grand nombre mais comportant moins de racines (Zulfiqar *et al.*, 2009). Pour expliquer ces variations du comportement morphogénique des tissus, les auteurs soutiennent que les bourgeons apicaux ont une concentration endogène d'auxine plus élevée que les bourgeons axillaires. Cette phytohormone favoriserait l'activation du signal de multiplication des tiges à faible concentration et la prolifération racinaire à plus forte concentration. Des recherches sur le Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) ont montré que la partie distale de boutures répond mieux à l'enracinement que les zones médiane et proximale, ce qui serait relié à l'augmentation du niveau d'auxine endogène de l'apex vers la base rapportée par Jacobs (1979) chez cette même espèce (Palanisamy et Kumar, 1997). Dans notre étude, tout comme dans les expériences de Koevary *et al.* (1978), des disparités ont été observées entre la réactivité des différents types d'explantats qui ont été utilisés pour régénérer des plantules de laitue. À la 8^e semaine de culture, les plantules provenant des explantats apicaux ont produit plus de feuilles et de racines (>1 cm) d'une part et d'autre part, à la 6^e semaine, le pourcentage de plantules ayant produit au moins une racine était nettement supérieur, comparativement aux plantules issues de bourgeons axillaires. Ceci est peut-être relié à la densité endogène d'auxine dans les

bourgeons au moment du prélèvement, mais aussi au fait que les bourgeons apicaux sont plus gros et mieux protégés par des primordia foliaires alors que les bourgeons axillaires en sont dépourvus. Leur présence au niveau du bourgeon apical est à l'origine du plus grand nombre de feuilles produites par les plantules issues de ce type d'explantat, puisqu'il est plus facile pour le jeune plant d'assurer la croissance des primordia que le développement de nouvelles feuilles.

1.4.3 Effets des composés phénoliques sur la régénération

Les phénols sont des composés chimiques, de nature variée, qui sont impliqués dans le métabolisme secondaire de la plante. La composition et la synthèse des phénols par les tissus végétaux dépendent du génome, mais aussi des conditions environnementales de la plante-mère (Ozyigit, 2008). Il existe deux écoles de pensées pour définir la relation entre les composés phénoliques d'un côté et la croissance et le développement d'un explantat en culture *in vitro* de l'autre. La première défend le fait que les composés phénoliques affectent positivement la prolifération *in vitro* des végétaux alors que l'autre avance le contraire. Ainsi, les composés phénoliques métabolisés auraient un effet positif en agissant comme modulateurs du catabolisme de l'acide indole-acétique (AIA), régulant le développement en plantule viable (Arnaldos *et al.*, 2001). Par contre, les composés phénoliques sont très impliqués dans la synthèse de la paroi cellulaire, puisqu'ils sont les précurseurs de la lignine, et avec la formation de la paroi secondaire s'accompagne une rigidité pouvant entraîner une réduction de la flexibilité (Kroon et Gary, 1999; Arnaldos, 2001; Ozyigit, 2008). La lignification des tissus serait impliqué dans l'arrêt de croissance chez la fraise (Arnaldos *et al.*, 2001; Ozyigit, 2008).

Les composés phénoliques sont exsudés des tissus endommagés, à la suite de la rupture cellulaire entraînée lors de l'aseptisation et de l'excision des explantats avant leur mise en culture. Le contact entre les composés phénoliques, les enzymes et l'air entraîne leur oxydation en des matériaux polymérisés ou en quinones hautement toxiques, responsables de la perte de l'extensibilité de la paroi (Kroon et Gary, 1999). Les recherches de Zenk et Müller (1964) ont démontré une corrélation positive entre l'étendue de la surface endommagée et la quantité d'AIA-oxydé qui s'y accumule. L'augmentation de composés phénoliques oxydés dans le milieu se traduit par une augmentation de la coloration brunâtre de celui-ci et

pouvant causer la mort de l'explantat (Ozyigit *et al.*, 2007; Ozyigit, 2008). Il est possible qu'une paroi rigide manque de perméabilité, inhibant ainsi la communication cellulaire qui est indispensable à l'organogénèse.

Lors de la régénération directe des explantats de laitue, l'oxydation des composés phénoliques a été plus importante chez les plantules issues de bourgeons apicaux et ce indépendamment du type de coupe ($p < 0.05$). Les composés phénoliques n'ont pas inhibé la régénération aérienne, mais plutôt l'enracinement, tel qu'illustré par une corrélation négative entre la quantité de racines produite et l'indice d'opacité du milieu à la 6^e semaine ($r = -0.36^{**}$). Ceci a eu un effet sur le pourcentage d'explantat régénérés en plantules viables pour plusieurs traitements. Ozyigit (2008) a obtenu des résultats similaires chez le coton (*Gossypium hirsutum* L.), puisque les bourgeons ont régénéré des tiges sans qu'il y ait formation de racines, ce qui serait lié à l'exsudation de composés phénoliques. Celle-ci serait aussi responsable de la mort de plusieurs explantats de cotonnier.

Ces mêmes plantules de laitue ont également montré le plus fort pourcentage de cal de type brun à la base de la tige. Chez l'olivier, les cals deviennent bruns plus rapidement pendant l'établissement de la culture quand les explantats sont prélevés en été. Ceci serait lié à l'activité oxydative de certains enzymes ainsi qu'à la concentration endogène des composés phénoliques chez la plante-mère au moment du prélèvement (Roussos *et al.*, 2007). Les recherches de Naz *et al.* (2008) portant sur la régénération indirecte ont démontré que la concentration de phénols et le brunissement des cals étaient corrélés avec l'augmentation du nombre de sous-cultures chez *Cicer arietinum*; ceci suggère une inhibition de la croissance et de la morphogénèse du cal en relation avec l'accumulation de phénols dans les tissus.

Par ailleurs, les plantules issues des bourgeons apicaux ayant subi une coupe DAL et TRA étaient accompagnées d'une plus forte coloration du milieu de culture. Une cause plausible de ce phénomène serait que la quantité de cellules endommagées lors de l'aseptisation en profondeur des tissus, qui sont par la suite transférés sur le milieu de culture pour être régénérés, est plus élevée chez ce type de coupes. Ces tissus, qui ont été en contact avec la solution désinfectante, n'ont pas été excisés totalement avant la mise en culture. La rupture de parois cellulaires survenues chez ces tissus lors de la stérilisation aurait eu pour effet d'augmenter considérablement la libération de composées phénoliques dans le milieu de culture.

1.5 CONCLUSION

Pour cloner efficacement la laitue, il faut d'abord prendre en considération l'âge physiologique et l'état général de la plante-mère. Lors du prélèvement des bourgeons sur les cœurs de laitues sélectionnées, la position, la taille et le type de coupe de l'explantat affectent l'indice d'opacité du milieu, ce qui a un effet direct à la fois sur la survie et sur le développement *in vitro* de la plantule de laitue. Cette étude a permis d'identifier la coupe de type diamant avec 6 mm de tissu sous-jacent au méristème, appliquée à des explantats issus de bourgeons apicaux, comme étant le traitement favorisant la meilleure régénération des explantats en plantules viables. Toutefois, même si l'utilisation de bourgeons axillaires entraînait une régénération plus faible de 29 % par rapport aux bourgeons apicaux, le plus grand nombre d'explantats disponibles par plant de laitue augmenterait les chances d'obtenir au moins une plantule viable.

TABLEAU 1.1 Matrice de corrélation de Pearson (n-1)

Var ^{yz}	nofe3	nofe6	nofe8	fe3	fe6	nora3	nora6	ra3
nofe3	1							
nofe6	0.93****	1						
nofe8	0.88****	0.94****	1					
fe3	0.81****	0.82****	0.81****	1				
fe6	0.65****	0.69****	0.66****	0.86****	1			
nora3	0.58****	0.52****	0.47****	0.53****	0.43****	1		
nora6	0.55****	0.62****	0.59****	0.53****	0.53****	0.80****	1	
ra3	0.43****	0.51****	0.49****	0.50****	0.58****	0.71****	0.82****	1
ra6	0.47****	0.57****	0.53****	0.58****	0.64****	0.70****	0.79****	0.95****
ram6	0.35**	0.46****	0.47****	0.34**	0.41***	0.45****	0.61****	0.62****
lmra8	0.33**	0.47****	0.49****	0.27*	0.27*	0.38**	0.65****	0.57****
ratioRF3	-0.17	-0.17	-0.20	-0.08	-0.05	0.49****	0.32**	0.31**
ratioRF6	-0.35**	-0.32**	-0.33**	-0.36**	-0.22	0.22	0.40***	0.33**
cal3	0.45****	0.36**	0.30**	0.34**	0.27*	0.75****	0.53****	0.55****
cal6	-0.15	-0.09	-0.15	-0.21	-0.14	0.34**	0.41***	0.41***
calb3	0.31**	0.26**	0.21	0.20	0.19	0.15	0.06	0.11
calb6	0.10	0.15	0.07	0.02	0.05	0.48****	0.55****	0.51****
calv3	0.38***	0.37***	0.36**	0.38**	0.30**	0.59****	0.55****	0.55****
calv6	-0.30**	-0.27*	-0.25*	-0.18	-0.12	-0.30**	-0.26*	-0.16
io3	0.39***	0.35**	0.31**	0.16	-0.01	-0.26*	-0.30**	-0.37**
io6	0.29**	0.25*	0.20	0.14	0.06	-0.35**	-0.36**	-0.38***
iopl3	0.59****	0.55****	0.48****	0.41***	0.28*	0.09	0.05	-0.02
iopl6	0.11	0.11	0.06	-0.09	-0.20	-0.36**	-0.27*	-0.38**
mort3	-0.14	-0.17	-0.18	-0.31**	-0.42***	-0.06	-0.09	-0.20
mort6	-0.46****	-0.50****	-0.47****	-0.69****	-0.82****	-0.28*	-0.34****	-0.47****
mort8	-0.41***	-0.45****	-0.39***	-0.63****	-0.78****	-0.60****	-0.64****	-0.77****
con3	-0.21	-0.31**	-0.37**	-0.37**	-0.35**	-0.21	-0.40****	-0.48****
con6	-0.25	-0.30**	-0.34**	-0.34**	-0.39***	-0.27**	-0.40****	-0.48****
viab3	0.66****	0.73****	0.72****	0.84****	0.78****	0.72****	0.77****	0.81****
viab6	0.52****	0.62****	0.58****	0.65****	0.72****	0.67****	0.79****	0.92****
viab8	0.45****	0.51****	0.45****	0.63****	0.74****	0.63****	0.70****	0.84****
bflo6	0.20	0.27*	0.28*	0.25*	0.22*	0.20	0.20	0.23*
bflo8	0.02	0.12	0.14	0.05	0.11	0.12	0.24*	0.25*
lgti8	0.55****	0.68****	0.71****	0.50****	0.49****	0.48****	0.68****	0.61****

Var ^{yz}	ra6	ram6	lmra8	ratioRF3	ratioRF6	cal3	cal6	calb3
nofe3								
nofe6								
nofe8								
fe3								
fe6								
nora3								
nora6								
ra3								
ra6	1							
ram6	0.63****	1						
lmra8	0.61****	0.64****	1					
ratioRF3	0.27*	0.25*	0.25*	1				
ratioRF6	0.23*	0.17	0.34**	0.58****	1			
cal3	0.50****	0.46****	0.35***	0.64****	0.27*	1		
cal6	0.39***	0.34**	0.39***	0.45****	0.63****	0.38***	1	
calb3	0.14	0.16	0.18	0.17	-0.05	0.37***	-0.11	1
calb6	0.48****	0.50****	0.40***	0.48****	0.59****	0.54****	0.74****	0.06
calv3	0.51****	0.44****	0.34**	0.41***	0.19	0.69****	0.34***	-0.21
calv6	-0.13	-0.26*	-0.12	-0.19	-0.04	-0.33**	0.16	-0.21
io3	-0.30**	-0.23*	-0.06	-0.42****	-0.48****	-0.17	-0.45****	0.38***
io6	-0.29**	-0.26*	-0.10	-0.41***	-0.46****	-0.19	-0.45****	0.42***
iopl3	0.02	0.06	0.10	-0.05	-0.32**	0.30**	-0.34**	0.68****
iopl6	-0.31**	-0.28*	0.04	-0.32**	-0.10	-0.21	-0.15	0.25*
mort3	-0.26*	-0.09	-0.02	0.17	0.08	0.10	-0.01	-0.06
mort6	-0.56****	-0.38***	-0.24*	0.09	0.23*	-0.16	0.02	-0.22*
mort8	-0.80****	-0.50****	-0.34**	-0.26*	-0.11	-0.45****	-0.26*	-0.13
con3	-0.49****	-0.43****	-0.44****	0.06	0.03	-0.10	-0.10	0.09
con6	-0.47****	-0.54****	-0.39***	-0.09	-0.04	-0.26*	-0.14	-0.09
viab3	0.83****	0.53****	0.44****	0.11	-0.06	0.46****	0.11	0.10
viab6	0.98****	0.63****	0.59****	0.19	0.16	0.44****	0.31**	0.13
viab8	0.89****	0.58****	0.43****	0.21	0.09	0.44****	0.30**	0.15
bflo6	0.27*	0.15	0.19	0.03	-0.03	0.12	0.03	0.00
bflo8	0.27*	0.27*	0.38***	0.23*	0.17	0.20	0.22	0.03
lgti8	0.61****	0.62****	0.66****	0.16	0.07	0.42***	0.18	0.13

Var ^{yz}	calb6	calv3	calv6	io3	io6	iopl3	iopl6	mort3
nofe3								
nofe6								
nofe8								
fe3								
fe6								
nora3								
nora6								
ra3								
ra6								
ram6								
lmra8								
ratioRF3								
ratioRF6								
cal3								
cal6								
calb3								
calb6	1							
calv3	0.40***	1						
calv6	-0.43****	-0.12	1					
io3	-0.29**	-0.33**	-0.11	1				
io6	-0.28*	-0.42***	-0.12	0.82****	1			
iopl3	-0.04	-0.03	-0.30**	0.76****	0.69****	1		
iopl6	-0.08	-0.38***	0.01	0.69****	0.75****	0.50****	1	
mort3	-0.02	0.15	0.00	-0.10	-0.18	0.01	-0.02	1
mort6	-0.12	-0.13	0.14	0.04	-0.16	-0.17	0.16	0.60****
mort8	-0.41***	-0.42****	0.18	0.34*	0.27*	-0.00	0.43****	0.33**
con3	-0.02	-0.29**	-0.05	0.28*	0.25*	0.17	0.32**	0.22*
con6	-0.17	-0.28*	0.12	0.21	0.15	0.00	0.24*	0.31**
viab3	0.30**	0.53****	-0.20	-0.17	-0.21	0.14	-0.31**	-0.24*
viab6	0.43****	0.48****	-0.11	-0.26*	-0.26*	0.05	-0.30**	-0.28*
viab8	0.43****	0.45****	-0.15	-0.32*	-0.26*	0.02	-0.40***	-0.32**
bflo6	0.07	0.14	-0.03	0.04	-0.07	0.04	-0.15	-0.03
bflo8	0.20	0.23*	-0.03	-0.14	-0.20	-0.05	-0.14	0.20
lgti8	0.32**	0.44****	-0.21	-0.03	-0.11	0.21	-0.13	0.02

Var ^{yz}	mort6	mort8	con3	con6	viab3	viab6	viab8	bflo6
nofe3								
nofe6								
nofe8								
fe3								
fe6								
nora3								
nora6								
ra3								
ra6								
ram6								
lmra8								
ratioRF3								
ratioRF6								
cal3								
cal6								
calb3								
calb6								
calv3								
calv6								
io3								
io6								
iopl3								
iopl6								
mort3								
mort6	1							
mort8	0.71****	1						
con3	0.46****	0.37***	1					
con6	0.54****	0.42***	0.73****	1				
viab3	-0.61****	-0.76****	-0.47****	-0.44****	1			
viab6	-0.60****	-0.82****	-0.50****	-0.48****	0.88****	1		
viab8	-0.68****	-0.92****	-0.45****	-0.51****	0.82****	0.92****	1	
bflo6	-0.18	-0.24*	-0.28*	-0.16	0.25*	0.28*	0.22	1
bflo8	0.00	-0.19	-0.19	-0.18	0.20	0.27*	0.21	0.59****
lgti8	-0.28*	-0.43****	-0.39***	-0.40***	0.62****	0.64****	0.49****	0.43****

Var ^{yz}	bflo8	lgti8
nofe3		
nofe6		
nofe8		
fe3		
fe6		
nora3		
nora6		
ra3		
ra6		
ram6		
lmra8		
ratioRF3		
ratioRF6		
cal3		
cal6		
calb3		
calb6		
calv3		
calv6		
io3		
io6		
iopl3		
iopl6		
mort3		
mort6		
mort8		
con3		
con6		
viab3		
viab6		
viab8		
bflo6		
bflo8	1	
lgti8	0.63****	1

^z Les variables (var) sont : nofe3= Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 3^e semaine; nofe6 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; nofe8 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 8^e semaine; fe3 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 3^e semaine; fe6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; nora3 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 3^e semaine; nora6 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; ra3 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 3^e semaine; ra6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ram6 = Repère de ramification racinaire (0 = aucune ramification et 3 = très ramifié) à la 6^e semaine; lmra8 = Longueur de la masse racinaire de la plantule (en cm) à la 8^e semaine (distance (en cm) entre le collet et 95 % de la masse racinaire); ratioRF3 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 3^e semaine; ratio RF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine; cal3 = Diamètre maximal (en mm) du cal, à la base des tiges à la 3^e semaine; cal6 = Diamètre maximal (en mm) du cal, à la base des tiges à la 6^e semaine; calb3 = Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 3^e semaine; calb6 = Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 6^e semaine; calv3 = Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 3^e semaine; calv6 = Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 6^e semaine; io3 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 3^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); io6 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); iopl3 = Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 3^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); iopl6 = Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); mort3 = Pourcentage de mortalité à la 3^e semaine; mort6 = Pourcentage de mortalité à la 6^e semaine; mort8 = Pourcentage de mortalité à la 8^e semaine; con3 = Pourcentage de contamination

bactérienne ou fongique dans le tube à la 3^e semaine (0 = absence de contamination et 1 = présence de contamination); con6 = Pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 6^e semaine (0 = absence de contamination et 1 = présence de contamination); viab3 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 3^e semaine; viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 6^e semaine; viab8 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 8^e semaine; bflo6 = Nombre de boutons floraux produits par les plantules à la 6^e semaine; bflo8 = Nombre de boutons floraux produits par les plantules à la 8^e semaine; lgti8 = Longueur de la tige de la plantule (en cm) à la 8^e semaine.

*, **, ***, **** significatif à $p < 0.05$; 0.01; 0.001 et 0.0001 respectivement.

TABLEAU 1.2 Anova à deux facteurs, type de coupe et type de bourgeon

Variables ^y	nofe8 ^z	fe6	nora6	ra6	ratioRF6	io6	lgti8	viab3	viab6	viab8
<i>Type de bourgeon</i>										
Apical	12.9	91.3	15.9	76.5	1.7	1.4	12.1	72.0	76.5	75.3
Axillaire	5.2	62.0	9.0	44.8	2.6	1.2	7.0	13.3	40.0	46.5
<i>Type de coupe^x</i>										
CAR3	9.0	71.3 ^{ab}	16.2 ^a	70.0 ^{ab}	3.1	1.0	10.0	47.5	65 ^{abc}	61.3 ^{abcde}
CAR6	8.8	83.8 ^a	13.9 ^{ab}	71.3 ^{ab}	2.5	0.9	10.5	53.8	67.5 ^{abc}	70.0 ^{abcd}
CAR9	9.9	76.3 ^{ab}	14.1 ^{ab}	67.5 ^{abc}	2.2	1.1	13.0	50.0	66.3 ^{abc}	65.0 ^{abcde}
DAL3	9.3	72.5 ^{ab}	10.7 ^{bc}	51.3 ^{bcd}	1.7	1.8	8.4	37.5	48.8 ^{bcd}	51.3 ^{bcdce}
DAL6	9.3	73.8 ^{ab}	6.2 ^c	35.0 ^d	0.9	1.7	6.5	23.8	35.0 ^d	41.3 ^e
DAL9	8.3	77.5 ^{ab}	6.8 ^c	31.3 ^d	0.8	1.9	5.5	16.3	31.3 ^d	43.8 ^{de}
DNT3	8.0	80.0 ^{ab}	15.8 ^a	72.5 ^{ab}	3.0	0.8	9.2	57.5	68.8 ^{ab}	71.3 ^{abc}
DNT6	8.8	83.8 ^a	15.2 ^{ab}	82.5 ^a	2.7	0.9	11.3	55.0	80.0 ^a	80.0 ^a
DNT9	9.1	81.3 ^{ab}	15.4 ^{ab}	80.0 ^a	2.7	1.1	11.5	53.8	76.3 ^a	76.3 ^{ab}
TRA9	9.9	66.3 ^b	10.4 ^{bc}	45.0 ^{cd}	1.6	1.6	9.1	31.3	43.8 ^{dc}	48.8 ^{ode}
<i>Effets significatifs^w</i>										
Type de coupe	NS	*	****	****	****	****	***	****	****	****
Type de bourgeon	****	****	****	****	****	*	****	****	****	****
Coupe * Bourgeon	***	NS	NS	NS	*	**	***	*	NS	NS

^z Pour cette variable, les analyses ont été appliquées sur les valeurs transformées par la fonction racine carrée.

^y nofe8 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 8^e semaine, les données ont été transformées ($\sqrt{}$) avant analyse; fe6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; nora6 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; ra6 = Pourcentage de plantules ayant produit au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ratioRF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules viables] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules viables] à la 6^e semaine, les données ont été transformées ($\sqrt{}$) avant analyse; io6 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); lgti8 = Longueur de la tige de la plantule (en cm) à la 8^e semaine (distance entre le collet et la cime); io6 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); viab3 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 3^e semaine; viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 6^e semaine; viab8 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 8^e semaine.

^x Les variables ayant des lettres différentes en exposant sont considérées comme significativement différentes selon Tuckey ($\alpha = 0.05$).

^w NS, *, **, ***, **** non significatif ou significatif à $p < 0.05$; 0.01; 0.001 et 0.0001 respectivement.

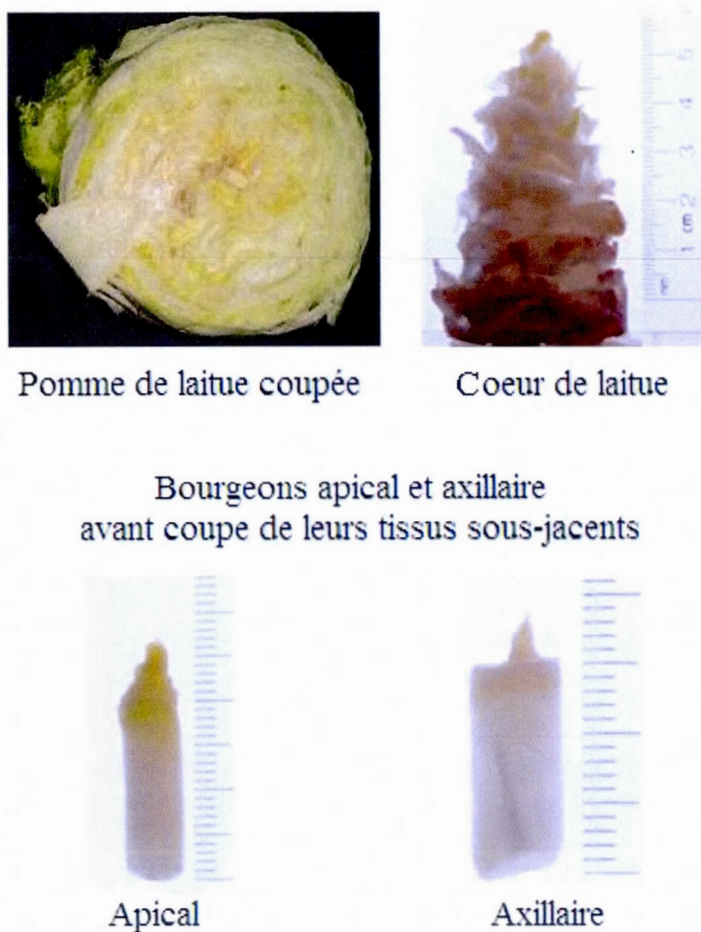


FIGURE 1.1 Matériel végétal utilisé pour extraire les explantats issus de bourgeons apicaux et axillaires situés dans le cœur de la pomme de laitue.

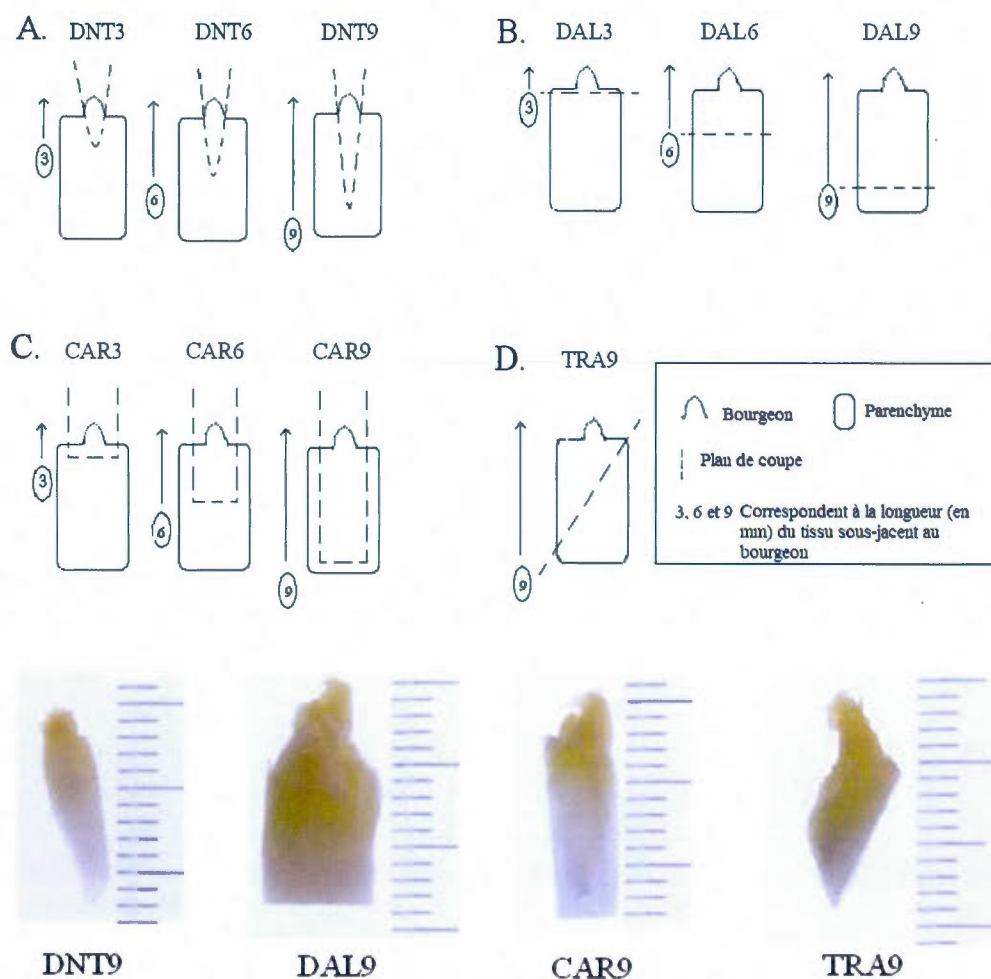


FIGURE 1.2 Schéma des différents types de coupes des explantats : A) type diamant : DNT, B) type diamétral : DAL, C) type carré : CAR et D) type transversal : TRA. Photos d'explantats issus de bourgeons apicaux ayant subi les traitements de coupes correspondants (plus petite graduation = 1 mm).

Plantules



Après 3 semaines de culture en tube



Après 6 semaines de culture, juste avant la période d'acclimatation

FIGURE 1.3 Régénération observée après 3 et 6 semaines de culture, (plus petite graduation = 1 mm).

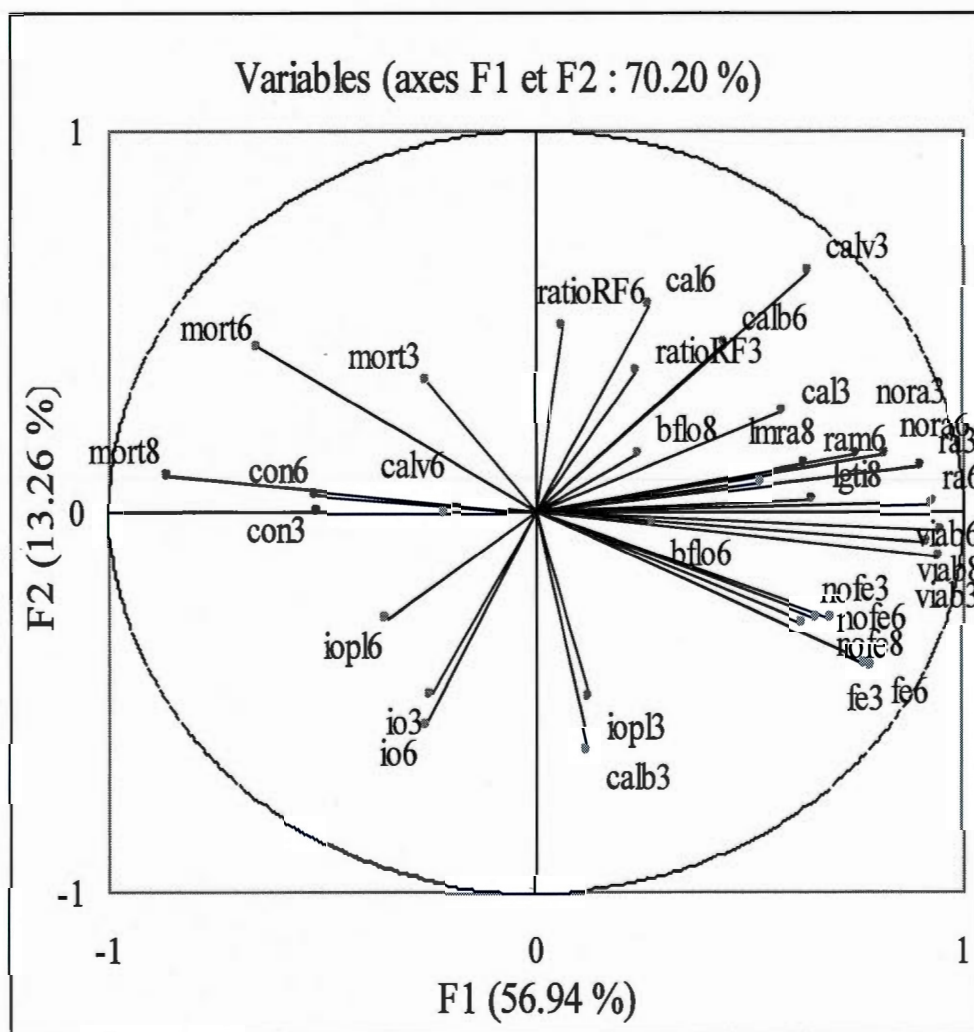


FIGURE 1.4 Analyse en composantes principales effectuée sur les variables mesurées pour le type de coupe :

Nofe3, nofe6 et nofe8 = nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites; fe3 et fe6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm); lgti8 = longueur de la tige du plant (en cm); nora3 et nora6 = nombre de racines (≥ 1 cm) produites; ram6 = ramification racinaire (0 = absence de ramification et 3 = très ramifiées); ra3 et ra6 = pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm); ratioRF3 et ratio RF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable]; mort3, mort6 et mort8 = pourcentage de plants morts; cal3 et cal6 = diamètre maximal du cal (en mm); calb3 et calb6

= pourcentage de cal brun; calv3 et calv6 = pourcentage de cal vert; io3 et io6 = indice d'opacité du milieu de culture (0 = milieu translucide à 5 = milieu très opaque); iopl3 et iopl6 = indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide à 5 = milieu très opaque); bflo3, bflo6 et bflo8 = nombre de boutons floraux; viab3, viab6 et viab8 = pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins 1 racine et une feuille ≥ 1 cm). Ces variables ont été prélevées à la fin des 3^e, 6^e et 8^e semaines en culture, dépendamment du chiffre qui suit l'abréviation de la variable.

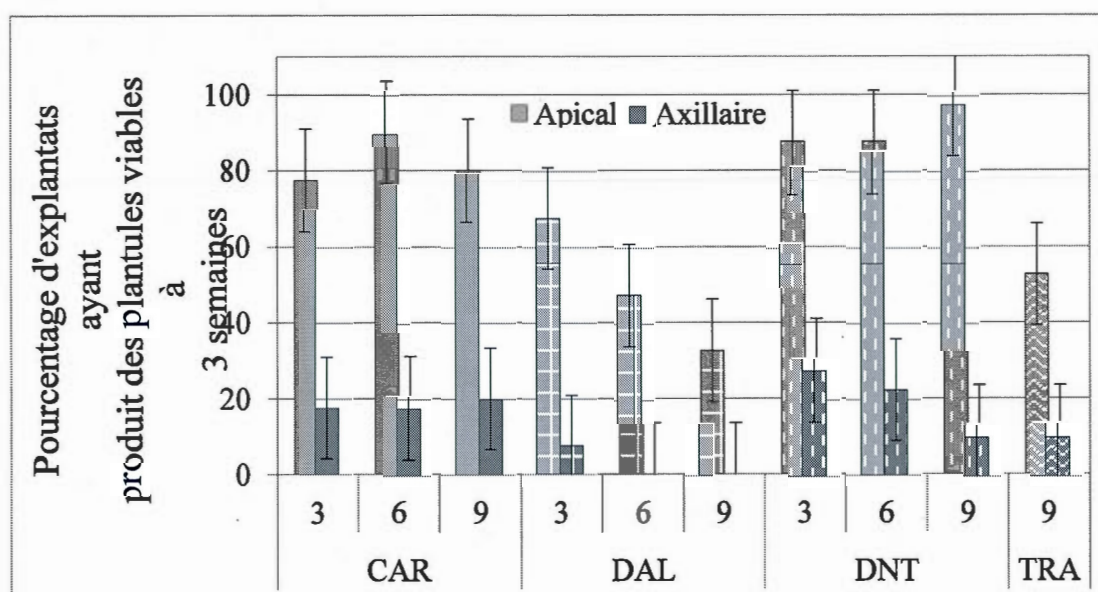


FIGURE 1.5 Pourcentage d'explants régénérés en plantules viables pour chacune des coupes, en fonction de chacun des types de bourgeons (apicaux et axillaires) dont est issue la plantule, à la 3^e semaine *in vitro*. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

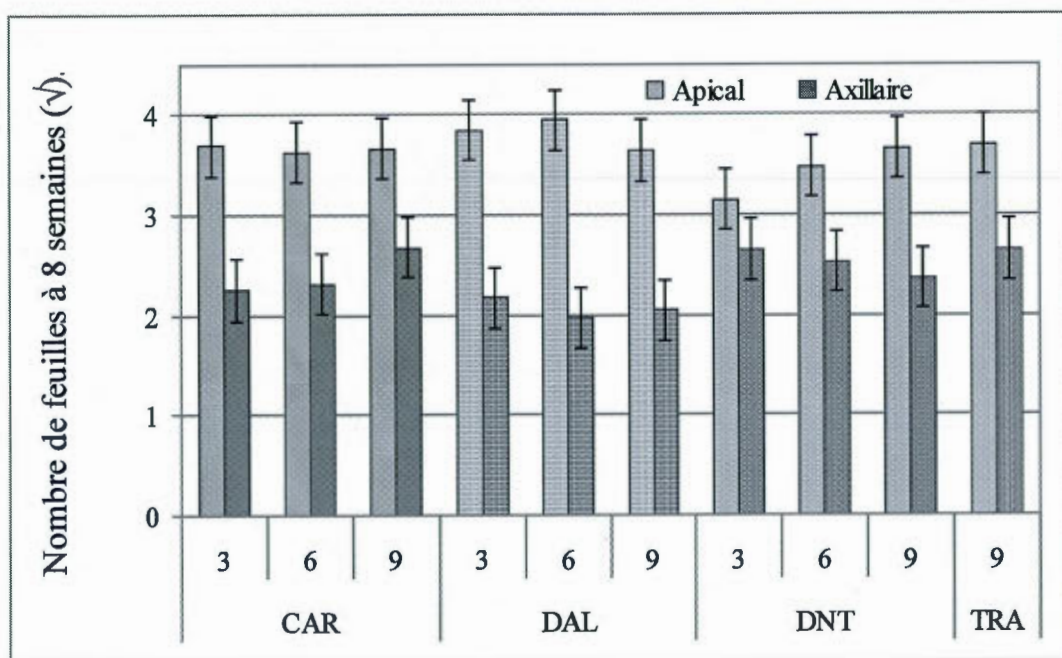


FIGURE 1.6 Nombre de feuilles produites par chaque plantule en fonction du type de coupe, selon le type de bourgeon (apical ou axillaire) dont est issue la plantule, à la 8^e semaine. Ce sont des données transformées ($\sqrt{}$). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

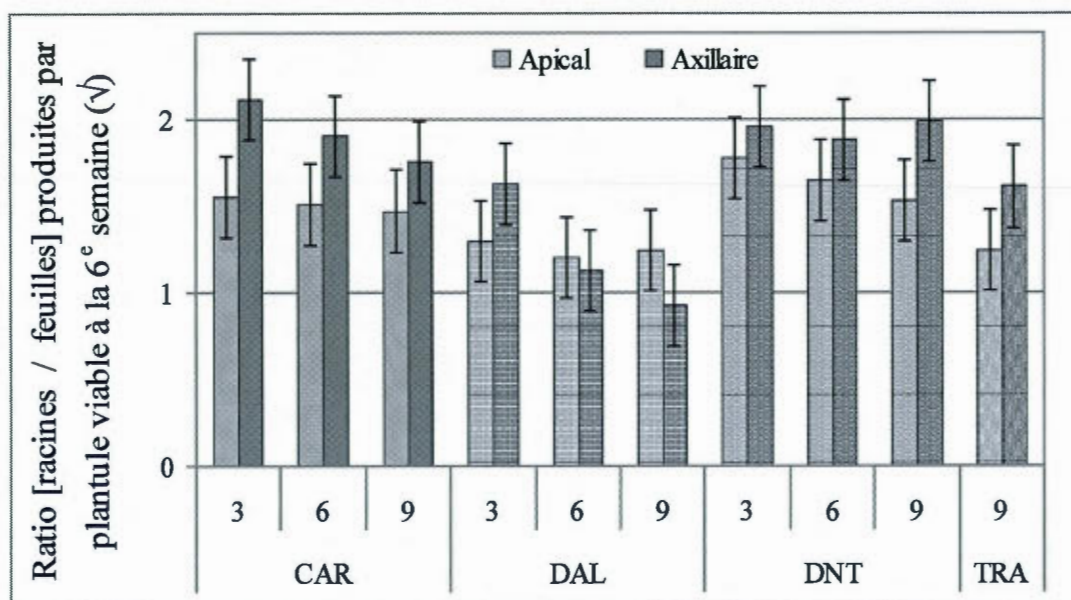


FIGURE 1.7 Ratio; [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] pour chacune des coupes à la 6^e semaine *in vitro*, en fonction du type de bourgeon (apical ou axillaire) dont est issue la plantule. Ce sont des données transformées ($\sqrt{}$). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

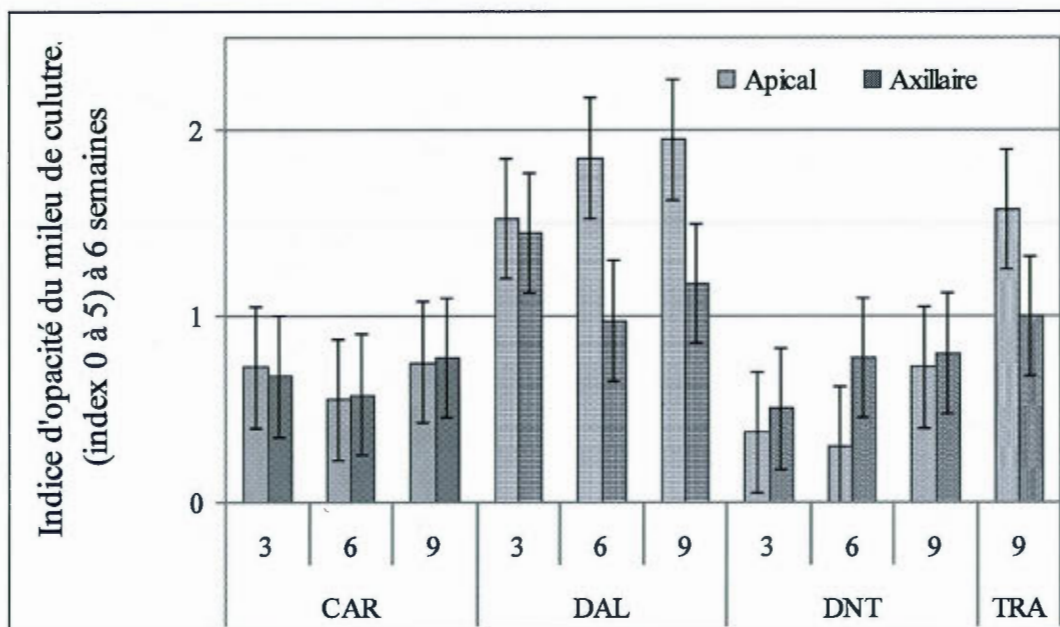


FIGURE 1.8 Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine *in vitro* selon le type de bourgeon dont la plantule est issue. Ce paramètre est évalué sur une échelle allant de 0 à 5, 0 correspondant à l'absence de coloration et 5 à une forte coloration. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

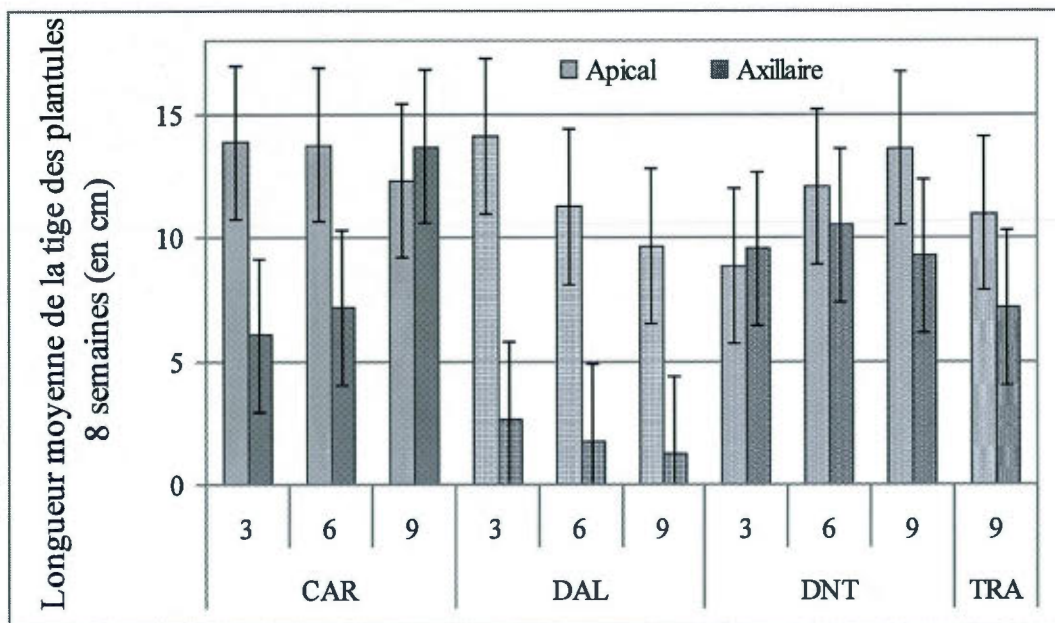


FIGURE 1.9 Longueur moyenne de la tige des plantules pour chacune des coupes à la 8^e semaine selon le type de bourgeon dont la plantule est issue. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

1.6 BIBLIOGRAPHIE

- Addinsoft 2007. XLSTAT software. Release 2007. New York, NY, Addinsoft U.S.A
- Arnaldos T.L., R. Munoz, M.A. Ferrer et A.A. Calderòn. 2001. «Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) callus culture». *Physiologia Plantarum*, vol. 113, no 3, p. 315 - 322.
- Bloksberg L.N. et M.E.J. Salveit. 1986. «Regeneration of plants from axillary buds of harvested and stored heads of field-grown Iceberg lettuce». *Hortscience*, vol. 21, no 5, p. 1201-1203.
- Brown C., J.A. Lucas, I.R. Crute, G.A. Walkey et J.B. Power. 1986. «An assessment of genetic variability in somacloned lettuce plants (*Lactuca sativa*) and their offspring». *Annals of Applied Biology* vol. 109, p. 391- 407.
- Hunter D.C. et D.J. Buritt. 2002. «Improved adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.)». *Scientia Horticulturae*, vol. 95, p. 269-276.
- Jenni S., F. Loukili et B.E. Moghaddam. 2006. «*In vitro* culture response of apical and axillary shoot-tips excised from crisphead lettuce cores depends on head maturity, not storage time». *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, vol. 42, no May-June, p. 274-277.
- Kim I., E. Cho, K. Crawford, F.D. Hempel et P.C. Zambryski. 2005. «Cell-to-cell movement of GFP during embryogenesis and early seedling development in *Arabidopsis*». *The National Academy of Sciences of the USA*, vol. 102, no 6, p. 2227-2231.
- Kim J.-Y., Z. Yuan et D. Jackson. 2003. «Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in *Arabidopsis*». *Development*, vol. 130, p. 4351-4362.
- Koevary K., L. Rappaport et L.L. Morris. 1978. «Tissue culture propagation of head lettuce». *Hortscience*, vol. 13, no 1, p. 39-41.
- Kroon P.A. et W. Gary. 1999. «Hydroxycinnamates in plants and food:current and future perspectives». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 79, p. 355-361.
- Laurence C.C. et L.O. Robyn. 2005. «Changes in macromolecular movement accompany organogenesis in thin cell layers of *Torenia fournieri*». *Planta*, vol. 222, p. 933-946.
- Murashige T. et F. Skoog. 1962. «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures». *Plant Physiology*, vol. 15, p. 473-497.
- Naz S., A. Ali et J. Iqbal. 2008. «Phenolic content *in vitro* cultures of chick pea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis». *Pakistan Journal of Botany*, vol. 40, no 6, p. 2525-2539.

- Nhut T.D., T.T.A. Trunong, T.D.H. Nguyen, T.D. Nguyen, Q.T. Nguyen et H.V. Nguyen. 2007. «Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverses thin cell layer culture». *Scientia Horticulturae*, vol. 111, p. 146- 151.
- Ozyigit I.I. 2008. «Phenolic changes during *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips». *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no 8, p. 1145-1150.
- Ozyigit I.I., M.V. Kahraman et O. Ercan. 2007. «Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.)». *African Journal of Biotechnology*, vol. 6, no 1, p. 003-008.
- Palanisamy K. et P. Kumar. 1997. «Effect of position, size of cuttings and environmental factors on adventitious rooting in neem (*Azadirachta indica* A.Juss)». *Forest Ecology and Management*, vol. 98, p. 277-280.
- Rinne P., A. Saarelainen et O. Junttila. 1994. «Growth cessation and bud dormancy in relation to ABA level in seedlings and coppice shoot of *Betula pubescens* as affected by a short photoperiod, water stress and chilling». *Physiologia Plantarum*, vol. 90, p. 451-458.
- Roussos P.A., A. Matsoukis, C.A. Pontikis et A. Chronopoulou-Sereli. 2007. «Relations of environmental factors with the phenol content and oxidative enzyme activities of olive explants». *Scientia Horticulturae*, vol. 113, p. 100-102.
- SAS Institute Inc. 1999. *The SAS system for windows*, Release 8.2. Cary, N.C.: SAS Institute
- Teixeira da Silva J.A. 2003. «Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology». *African Journal of Biotechnology*, vol. 2, no 12, p. 683 - 691.
- Warren Wilson J., W.M.S. Keys, P.M. Warren Wilson et L.W. Roberts. 1994. «Effects of auxin on the spatial distribution of cell division and xylogenesis in lettuce pith explants». *Protoplasma*, vol. 183, p. 162-181.
- Zenk M.H. et G. Müller. 1964. «Über den Einfluss der Wundflächen auf die enzymatische oxydation der Indol-3-essigsäure *in vivo*». *Planta*, vol. 61, p. 346-351.
- Zulfiqar B., N.A. Abbasi, T. Ahmad et I.A. Hafiz. 2009. «Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte». *Pakistan Journal of Botany*, vol. 41, no 5, p. 2333-2346.

CHAPITRE II

EFFET DU CULTIVAR SUR LA RÉGÉNÉRATION *IN VITRO* DE LA LAITUE (*LACTUCA SATIVA* L.) À PARTIR DE BOURGEONS APICAUX ET AXILLAIRES

RÉSUMÉ

Des explantats issus de bourgeons apicaux et axillaires provenant de cultivars de laitue (*Lactuca sativa* L.) pommée (cvs Estival, Ithaca, Eldorado) et romaine (cv Sunbelt) ont été utilisés pour étudier l'effet du génotype sur la régénération *in vitro*. Estival est résistant à la montaison et les 3 autres y sont sensibles. La régénération a été considérée réussie lorsqu'un bourgeon se développait en une plantule viable (pourvue d'au moins une feuille et une racine ≥ 1 cm). Parmi les différences observées, chez les plantules viables issues des bourgeons apicaux des trois cultivars sensibles à la montaison ELD, ITH et SUN, les tiges ont été plus longues ($p < 0.05$) à la 8^e semaine comparativement à celles du cultivar résistant EST. Les plantules issues de ce même type de bourgeons et du cultivar de laitue romaine SUN (20.7 feuilles, $p < 0.001$) ont produit plus de feuilles que les autres cultivars de laitue pommées. Les plantules régénérées à partir de bourgeons axillaires du cultivar ELD ont formé plus de racines (22.3, $p < 0.01$) que celles provenant d'EST et d'ITH (6.5 – 11.5, $p < 0.01$) mais sans différer de SUN (14.9, $p < 0.01$). Par ailleurs les racines d'ELD (0.5, $p < 0.05$) ont été moins ramifiées que celles d'ITH sans différer significativement de celles des autres cultivars, indépendamment du type de bourgeon. De plus ELD (1.45, $p < 0.01$) a eu un indice d'opacité du milieu de culture pour les plantules viables régénérées à partir de bourgeons apicaux supérieur à celui d'EST et de SUN (0.53 – 0.15, $p < 0.01$), tout en ayant un indice similaire à ITH (1.0, $p < 0.01$). Le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables n'est cependant pas affecté par le cultivar, mais plutôt par le type de bourgeon. En effet les explantats issus de bourgeons apicaux ont montré une meilleure régénération (48.1-80.7 et 83.1%, $p < 0.0001$) que ceux issus de bourgeons axillaires (1.3-45.0 et 50.6%, $p < 0.0001$). Leurs plantules ont formé 7.7 ($p < 0.0001$) feuilles et 2 ($p < 0.01$) racines de plus, et

avaient une tige plus longue de 6.3 cm ($p < 0.0001$) comparativement aux plantules issues de bourgeons axillaires.

MOTS CLÉS

Lactuca sativa L., *in vitro*, bourgeons apicaux et axillaires, effet génotypique, Eldorado, Ithaca, Estival, Sunbelt, sensibilité à la montaison.

2.1 INTRODUCTION

L'organogenèse *in vitro* est influencée par plusieurs facteurs et certains d'entre eux sont plus difficiles, voire même impossibles à contrôler (Georges, 1993). L'effet génotypique et la variation somaclonale font partie des paramètres dont il est difficile de prévoir l'incidence. Dans le cadre d'un projet d'amélioration génétique de la laitue, l'utilisation de la culture *in vitro* vise à préserver les caractères agronomiques améliorés des cultivars pour les générations futures. Or en culture *in vitro* il peut arriver que les cultivars ne se prêtent pas à cette technique à l'intérieur d'une même espèce. Possiblement en raison de la variation somaclonale d'une part et d'une faible capacité de régénération de l'explantat d'autre part, des facteurs qui sont liés aux caractères génotypiques du cultivar et qui peuvent nuire à l'organogenèse des plantules..

Le présent projet vise à évaluer l'effet du cultivar sur la régénération *in vitro* de la laitue. Contrairement aux études de Brown (1986), Ampomah-Dwamena *et al.* (1997), Hunter et Buritt (2002) et Mohebodini (2011), qui ont utilisé des cotylédons, nos cultures ont été initiées à partir d'explantats issus de bourgeons (apicaux et axillaires) de cœurs de laitue. Ce type d'explantat réduit la possibilité d'obtenir des variants somaclonaux (Blokberg et Salveit, 1986), en raison de l'absence des étapes de dédifférenciation et de redifférenciation cellulaires lors de l'organogénèse. Ceci augmente nos chances d'effectuer nos évaluations sur l'expression du génome original de la plantule et non sur des mutations survenues lors de l'étape de clonage. Les deux types de bourgeons ont été prélevés sur quatre cultivars, Ithaca, Estival, Eldorado et Sunbelt, génétiquement homogènes, homozygotes à plus de 99%, appartenant à trois groupes morphologiques; il s'agit de la laitue pommée de type Great Lakes, la pommée de type Vangard et la laitue Romaine. En dehors des caractéristiques physiologiques propres à chacun des cultivars, qui permettent de les distinguer les uns des autres, nous avons pris soin de choisir un élément physiologique facile à suivre pour l'évaluateur. En effet, le cultivar Estival est résistant à la montaison, les autres y sont sensibles.

2.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.2.1 Matériel végétal

Ithaca (Wehner, 2002) est un cultivar de type Iceberg (Great Lakes) qui a été développé à l'Université Cornell aux États-Unis dans les années 1960. Il produit une pomme ferme à larges feuilles, solides et qui se replient de façon serrée les unes sur les autres. Croquante et délicieuse, elle ne deviendra pas amère. Ithaca a été développé pour sa résistance à la brûlure de pointe et aux températures chaudes de l'été (Wehner, 2002). Pour cette raison, il a été très commercialisé au cours des 40 dernières années auprès des agriculteurs qui produisent en sol organique (Jenni et Emery, 2008). Bien qu'il ait été développé pour la formation tardive de sa hampe florale (Wehner, 2002), Ithaca est considéré comme moins résistant à la montaison que le cultivar Estival dans la région de production du sud-ouest de Montréal.

Estival (EST) est le premier cultivar de laitue pommée de type Vanguard issu du programme d'amélioration génétique de la laitue du Centre de recherche et de développement en horticulture d'Agriculture et Agroalimentaire Canada, à Saint-Jean-sur-Richelieu. Il provient d'un croisement entre Valley Green (femelle) et Ithaca (mâle) (Jenni et Emery, 2008). C'est une laitue pommée qui produit une pomme lourde et très résistante à la montaison dans des conditions de croissance à jours longs (photopériode de plus de 13 heures). Estival est bien adapté aux sols organiques. D'autre part, il est plus tolérant qu'Ithaca à la nervation brune, un désordre physiologique se développant lors des conditions de croissance chaudes.

Eldorado (ELD) est une laitue pommée de type Salinas (Vanguard). Issu d'un croisement entre Kelvin et Mariska pour sa résistance à différentes souches de mildiou, ce cultivar est adapté pour les régions côtières de la Californie, ainsi que les sols minéraux. Eldorado est sensible à la montaison et à la nervation brune lorsque cultivé en sol organique sous un climat chaud, humide et dans les conditions de longue photopériode du Québec.

Sunbelt est un cultivar de laitue de type romaine issu d'un croisement entre Target, Darkland et Augustus (Avila *et al.*, 2005), adapté aux conditions climatiques de la région de la Californie et de l'Arizona. Il a été développé pour sa résistance à certaines maladies telles que la brûlure de pointe, la racine liégeuse et le mildiou. De plus, ses feuilles sont de couleur

vert sombre et la nervure centrale est lisse. Son cœur reste généralement assez court, mais ce cultivar est sensible à la montaison lorsque cultivé dans la région de Montréal.

Ces cultivars ont été sélectionnés de manière à mettre en évidence des différences au niveau de la régénération des plantules de laitue de même type ou de type différent. D'autre part l'évolution du caractère de résistance ou de sensibilité à la montaison est facilement mesurable sur la plantule en éprouvette lors des prises de données.

Les cœurs de laitue d'Ithaca et d'Eldorado ont été récoltés à la ferme expérimentale d'Agriculture Canada située à Sainte Clotilde, ceux d'Estival et de Sunbelt sur la Ferme Hotte et Van Winden (Napierville, QC). Tous les cœurs ont été récoltés le même jour (14 août 2009) et entreposés à 2 °C pendant 3, 4, 5 et 7 jours, ce qui correspond respectivement aux répétitions 1, 2, 3 et 4, avant l'extraction des explantats pour la mise en culture.

2.2.2 Prélèvement, aseptisation et excision des explantats

Dix cœurs de chacun des cultivars (facteur 1) ont été sélectionnés pour effectuer le prélèvement de deux types d'explantats (facteur 2); les bourgeons apicaux et axillaires ainsi que les tissus sous-jacents ont été extraits à l'aide d'un emporte-pièce en cuivre de 1 cm de large et 2.5 cm de long. Les explantats furent stérilisés par immersion avec agitation pendant 15 minutes dans de l'hypochlorite de sodium à 0.6 %, auquel une goutte de Tween 80 (Fisher Scientific BP338-500) par 100 ml a été ajoutée. Ensuite ils ont subi trois rinçages successifs de 5 minutes chacun dans de l'eau nanopure stérile (autoclavée pendant 20 minutes à 103.3 kPa et 121 °C). Avant la mise en culture, les explantats ont été taillés selon une coupe carrée à 6 mm de long, afin d'enlever les couches de tissus endommagés, au cours de l'étape d'aseptisation. Cette opération a été effectuée en conditions stériles.

2.2.3 Milieu de culture

Les explantats ont été mis en culture sur un milieu de base Murashige et Skoog (1962) renfermant du saccharose (30 g/l) et de l'agar (8 g/l, de type Bacto, Sigma M9274) et auquel 4.92 µM d'AIB (Sigma 15386-25G) ont été ajoutés. Une fois le pH ajusté à 5.7, le milieu nutritif fut versé dans des tubes de 25 x 150 mm (12 ml/tube) scellés avec des bouchons Kim Kap et le tout stérilisé à l'autoclave à 103.3 kPa et 121 °C, pendant 20 minutes. Les explantats ont été insérés dans le milieu jusqu'à la base du bourgeon,

immergeant ainsi tout le parenchyme. Aucun d'entre eux n'a été repiqué au cours de cette expérience. Ils ont été maintenus sur le même milieu pendant 6 semaines.

2.2.4 Acclimatation

Après la prise de données à la fin de la 6^e semaine *in vitro*, toutes les plantules vivantes ont été transférées en acclimatation pour une durée de 2 semaines. Elles ont été sorties des tubes et le reste de milieu adhérent aux racines a été délogé sous un filet d'eau du robinet. Les plantules sans racine ont été coupées à la base en dessous du collet. Puis la section coupée fut mise à tremper dans une solution d'AIB (Sigma i2886) à une concentration de 12.3 mM (2 500 ppm) pendant 15 secondes. Les plantules pourvues ou non de racines ont été mises dans des plateaux de germination en plastique noir (28 cm de large par 54.6 cm de long), remplis de vermiculite (Vermiculite Inc.) saturée d'eau (fig.1.2). Ils ont été utilisés en triple épaisseur pour les rigidifier.

Une fois les plateaux remplis de plantules (4 rangées x 9 plantules par rangée = 36 plantules par plateau), ils ont été recouverts d'un dôme non ventilé. Ces plateaux ont été placés à quatre par tablette dans une autre chambre à environnement contrôlé. Après une semaine les dômes non ventilés ont été remplacés par d'autres qui ont préalablement été perforés de trois ouvertures de 7 cm de largeur par 4 cm de hauteur chacune. La dernière prise de données a eu lieu à la fin des deux semaines de l'étape d'acclimatation.

2.2.5 Conditions environnementales dans la chambre de culture *in vitro* et d'acclimatation

La température moyenne était de 12 °C la nuit et 16 °C le jour. La photopériode de 16 heures à 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ a été assurée par des néons de 48'', 40 W (F40/ agro de Philips, Wesco, Saint-Jean-sur-Richelieu).

2.2.6 Dispositif expérimental

L'expérience a été conçue sous forme de plant factoriel complet. Ce dernier comprend 2 facteurs et 4 blocs répétitifs, à raison d'un bloc par jour. Chacun des blocs compte 80 individus représentant chacun un essai. Les explantats ont été répartis de façon aléatoire dans les blocs. Le bilan des traitements est le suivant :

4 cultivars x 2 types de bourgeons x 10 tubes par traitement (unité expérimentale) = 80 tubes par répétition x 4 = 320 tubes ou explantats.

Quarante plants par cultivars ont été utilisés, pour un total de 160 cœurs de laitue.

2.2.7 Variables mesurées

Afin de comparer les différents traitements, un certain nombre de variables quantitatives et qualitatives ont été relevées à trois périodes différentes. La première prise de donnée a eu lieu à la fin de la 3^e semaine *in vitro*, la seconde à la fin de la 6^e semaine *in vitro*, soit juste avant le début de l'acclimatation et la dernière à la fin de la 8^e semaine, soit après deux semaines d'acclimatation (les chiffres des codes réfèrent à la semaine de culture pendant laquelle le relevé a été effectué). Les variables qualitatives sont évaluées comme l'absence (0) ou la présence (1) du phénomène indiqué, permettant d'en déduire un pourcentage, ou son ampleur (de 0 à 5) (cf. liste des abréviations).

Les variables quantitatives comprenaient : nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites (nofe3, nofe6, nofe8), longueur de la tige de la plantule (lgti8, en cm), longueur de la masse racinaire après l'étape d'acclimatation (lmra8, en cm), nombre de racines (nora3, nora6), diamètre maximal du cal à la base des tiges (cal3, cal6, en mm), nombre de boutons floraux (bflo6, bflo8), pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges (calv3, calv6), pourcentage de mortalité (mort8), pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube (con3, con6), pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (viab3, viab6, viab8 : 0 = absence de feuille et/ou de racine ≥ 1 cm et 1 = présence d'au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) (fe3, fe6 et fe8); pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) (ra3, ra6 et ra8); [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] (ratioRF3 et ratioRF6).

Les variables qualitatives comprenaient : repère de ramification racinaire (ram6 : 0 = absence de ramification et 3 = système racinaire très ramifié), indice d'opacité du milieu de culture (io3, io6 : 0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) et indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) (iopl3 et iopl6).

Les pourcentages de mortalité, de contamination, de régénération en plantules viables, d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) et d'au moins une racine (≥ 1 cm), ainsi que l'indice d'opacité du milieu de culture, ont été relevés sur l'ensemble des tubes et calculés par rapport au nombre initial d'explantats mis en culture. Les autres variables ont été relevées sur les plantules viables régénérées et leurs pourcentages établis par rapport à ces dernières.

2.2.8 Analyse statistique

Dans un premier temps, une analyse en composantes principales (ACP) a été faite en utilisant le logiciel de traitement de données XLSTAT (Addinsoft, 2007), afin d'identifier les variables corrélées entre elles (Analyse du coefficient de corrélation de Pearson) et de sélectionner, parmi les variables mesurées pour chacun des cultivars, un sous-ensemble de variables pour les analyses subséquentes.

Par la suite une analyse de variance a été effectuée, en utilisant la procédure GLM (SAS Institute Inc, 1999), permettant ainsi la mise en évidence des différences significatives entre les traitements type de cultivar, le type de bourgeons, ainsi que leurs interactions.

Le modèle linéaire a été ajusté, pour chacune des répétitions, en faisant la moyenne des variables numériques et le pourcentage des variables binaires. Au besoin, certaines données ont été transformées, par la fonction logarithmique, pour satisfaire à l'homogénéité de variances, ainsi qu'à l'homoscédasticité et la normalité de distribution des résidus. Ces valeurs ont été représentées graphiquement à l'aide de barres représentant 95 % de l'intervalle de confiance.

2.3 RÉSULTATS

Les axes F1 et F2 de l'ACP (fig.2.1) expliquent 56.44 % de la variabilité ($p < 0.001$) des paramètres à l'étude. Des corrélations significatives ont été mises en évidence parmi les variables mesurées sur l'état de santé des plantules (tabl.2.1). Le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables à la 8^e semaine 'viab8' était positivement corrélé à 'viab3' ($r = 0.70^{****}$), au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) 'ra3' ($r = 0.66^{****}$) et au diamètre maximal du cal 'cal3' ($r = 0.63^{***}$), mais négativement corrélé au pourcentage de contamination 'con3' ($r = -0.71^{****}$) à la 3^e semaine. D'autre part 'viab8' était toujours négativement corrélé au pourcentage de contamination 'con6' ($r = -0.61^{****}$) et au pourcentage de mortalité 'mort6' ($r = -0.82^{****}$), mais positivement corrélé au pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables 'viab6' ($r = 0.96^{****}$), au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) 'ra6' ($r = 0.93^{****}$) et au pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges 'calb6' ($r = 0.85^{****}$) à la 6^e semaine *in vitro*. Finalement, 'viab8' était fortement et négativement corrélé au pourcentage de mortalité après l'acclimatation soit 'mort8' ($r = -0.81^{****}$), mais positivement et fortement corrélé au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) 'ra8' ($r = 0.98^{****}$) après la période d'acclimatation, soit à la 8^e semaine. D'autre part, le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables à la 3^e semaine 'viab3' était négativement corrélé au diamètre maximal du cal à la 6^e semaine 'cal6' ($r = -0.47^{****}$) et positivement corrélé à l'indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 3^e semaine 'iop13' ($r = 0.41^*$). Le pourcentage de régénération en plantules viables étant très important pour ce projet, ces trois variables (viab3, viab6 et viab8) ont été préservées pour l'analyse subséquente.

Pour ce qui est des variables mesurées sur les feuilles, le nombre de feuilles après l'acclimatation 'nofe8' était positivement corrélé au nombre de feuilles 'nofe3' ($r = 0.88^{****}$), à la longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule 'tfe3' ($r = 0.69^{****}$), au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) 'fe3' ($r = 0.71^{****}$), au pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges 'calv3' ($r = 0.69^{****}$) et au ratio nombre total de racines (≥ 1 cm)/nombre total de

feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable 'ratiRF3' ($r = 0.53^{**}$) à la 3^e semaine. D'autre part 'nofe8' était toujours positivement corrélé au nombre de feuilles 'nofe6' ($r = 0.92^{****}$), à la longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule 'tfe6' ($r = 0.77^{****}$) et au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) 'fe6' ($r = 0.64^{****}$) à la 6^e semaine. En dernier lieu 'nofe8' était positivement corrélé au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) 'fe8' ($r = 0.65^{****}$) à la 8^e semaine. La variable du nombre de feuilles produit par les plantules a été conservée pour les analyses subséquentes afin de quantifier le développement foliaire des plantules viables.

Parmi les variables caractérisant les racines, le nombre de racines produites par les plantules à la 6^e semaine 'nora6' était positivement corrélé au nombre de racines 'nora3' ($r = 0.44^*$) à la 3^e semaine, à la somme des longueurs (en mm) de toutes les racines de la plantule 'lgra6' ($r = 0.66^{****}$) et au ratio nombre total de racines (≥ 1 cm) / nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable 'ratiRF6' ($r = 0.57^{***}$) à la 6^e semaine. La variable 'ram6' était positivement corrélée à la somme des longueurs (en mm) de toutes les racines de la plantule 'lgra3' ($r = 0.55^{**}$) et à la longueur (en mm) atteinte par la plus longue racine de la plantule 'plgra3' ($r = 0.60^{***}$) à la 3^e semaine, d'une part et d'autre part à la longueur (en mm) atteinte par la plus longue racine de la plantule 'plgra6' ($r = 0.54^{**}$) à la 6^e semaine. La variable du nombre de racines produites par les plantules a été conservée pour les analyses subséquentes afin de quantifier le développement racinaire des plantules viables. Le repère de ramification racinaire 'ram6' n'étant pas significativement lié à 'nora6', il a été conservé pour les analyses subséquentes.

Il existait une relation très significative entre la longueur de la tige 'lgti8' et le nombre de boutons floraux produit par les plantules viables à la 6^e et la 8^e semaine, respectivement 'bflo6' ($r = 0.68^{****}$) et 'bflo8' ($r = 0.82^{****}$). Une moins forte corrélation positive existait entre 'lgti8' et le pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges 'calv6' ($r = 0.42^*$) à la 6^e semaine et avec la longueur de la masse racinaire de la plantule (en cm) à la 8^e semaine 'lmra8' ($r = 0.49^{**}$). La variable 'lgti8' avait été retenue car elle représente un outil de comparaison efficace entre les cultivars résistants et sensibles à la montaison.

L'indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables 'iopl6' était positivement corrélé à l'indice d'opacité à la 3^e et à la 6^e semaine *in vitro*, respectivement 'io3' ($r = 0.36^*$) et 'io6' ($r = 0.73^{****}$).

À la lumière de ces corrélations significatives, les variables les plus représentatives, parmi celles qui sont corrélées entre elles, ont été retenues pour les analyses de variance. Dans un premier temps, les variables quantitatives ont été priorisées. Ensuite, les paramètres faisant référence à des organes différents ont été sélectionnés pour enrichir l'analyse globale de l'expérience (nora6, nofe8 et lgti8). La variable pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 3^e semaine 'calb3' a été conservée parce qu'elle n'était corrélée à aucune des autres retenues. Certaines ont été retenues, bien que corrélées à une autre, pour montrer l'évolution dans le temps du pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (viab3, viab6 et viab8). D'autres ont simplement été mises de côté pour éviter la redondance de l'information. Après ce tri, neuf variables ont été retenues pour les analyses de variances, il s'agit de nofe8, nora6, ram6, iopl6, lgti8, calb3, viab3, viab6 et viab8.

L'interaction entre le cultivar et le type de bourgeon utilisé pour former l'explantat était significative (tabl.2.2) chez quatre des variables retenues; il s'agit du nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules viables (nofe8, $p < 0.01$) et de la longueur de la tige de la plantule (en cm) à la 8^e semaine (lgti8, $p < 0.05$), du nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules viables (nora6, $p < 0.01$) et de l'indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (iopl6, $p < 0.05$). Les autres variables retenues, à savoir le repère de ramification racinaire (0 = aucune ramification et 3 = très ramifié) à la 6^e semaine 'ram6', le pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 3^e semaine 'calb3' et le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables aux 3^e, 6^e et 8^e semaine 'viab3, viab6 et viab8', ne présentaient pas d'interactions significatives (tabl.2.2). Par conséquent, les effets principaux ont été utilisés pour comparer les résultats de ces variables.

Les explantats issus de bourgeons apicaux avaient un pourcentage de régénération en plantules viables nettement plus élevé ($p < 0.0001$) après 3, 6 et 8 semaines de culture (tabl.2.2), par rapport aux bourgeons axillaires. D'ailleurs toutes les plantules issues de bourgeons apicaux avaient un repère de ramification racinaire, plus élevé que celles issues des explantats de type axillaire, indépendamment du cultivar à la 6^e semaine *in vitro* (talb.2.2).

Indépendamment de la période de prise de données (aux 3^e, 6^e et 8^e semaines), aucune différence significative (tabl.2.2) n'a été observée entre les cultivars au niveau du pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables, mais des différences l'ont été au niveau des autres variables. C'est le cas par exemple pour la longueur de la tige, qui est le caractère morphologique distinctif chez certains des cultivars sélectionnés. En effet (fig.2.2), toutes les plantules issues de bourgeons apicaux avaient une tige plus longue que celles régénérées à partir de bourgeons axillaires chez un même cultivar, sauf chez EST où il n'y avait pas de différence. Toujours chez EST, la longueur moyenne de la tige des plantules issues d'apicaux était plus courte que celle des plantules provenant des autres cultivars. Indépendamment du cultivar, il n'y avait pas de différence au niveau de la longueur des tiges entre les plantules issues des bourgeons axillaires après l'acclimatation (8^e semaine).

Toujours dans le cadre du développement aérien, les plantules du cultivar de laitue romaine SUN issues des bourgeons apicaux, avaient plus de feuilles (fig.2.3) que celles régénérées à partir du même type de bourgeon et provenant des trois cultivars de laitue pommée (ELD, EST et ITH) après 8 semaines de culture. Les plantules viables issues des explantats apicaux avaient plus de feuilles que celles régénérées par des explantats axillaires chez tous les cultivars sauf ELD, chez qui il n'y avait pas de différence significative.

Par ailleurs, il n'y avait pas d'effet du cultivar sur le nombre de racines produites par les plantules viables provenant des bourgeons apicaux (fig.2.4). Elles avaient aussi un nombre équivalent de racines avec celles issues des bourgeons axillaires chez tous les cultivars sauf pour la laitue pommée EST, chez qui les plantules issues des axillaires en avaient moins. La quantité de racines produite par les plantules issues des bourgeons axillaires et du cultivar de laitue pommée ELD, était plus élevée que celles provenant des deux autres cultivars de laitue pommées EST et ITH, mais pas de la laitue romaine SUN. De plus, les plantules viables provenant (tabl.2.2) du cultivar ITH avaient des racines plus ramifiées que celles du cultivar ELD, sans pour autant être significativement différentes d'EST et de SUN indépendamment du type de bourgeon.

Au niveau du milieu de culture, à la 6^e semaine (fig.2.5), pour les plantules provenant de bourgeons apicaux, l'indice d'opacité du milieu des plantules viables du cultivar ELD était plus élevé que celui des cultivars EST et SUN, et l'indice d'ITH était plus élevé que celui du

cultivar SUN. Lorsque les plantules provenaient de bourgeons axillaires, l'indice était similaire pour tous les cultivars.

2.4 DISCUSSION

Chez la laitue, les études abordant l'effet du génotype sur la régénération *in vitro* ont été effectuées en utilisant des cotylédons comme explantats. Nos travaux se démarquent à ce niveau, les explantats étant constitués de bourgeons apicaux et axillaires prélevés de plantes-mères récoltées directement au champ au stade de maturité commerciale. Un effet génotypique sur la proportion de cotylédons produisant des tiges et racines a été relevé par Ampomah-Dwamena *et al.* (1997) et Hunter et Buritt (2002), alors que Mohebodini *et al.* (2011) rapportent un effet significatif du génotype sur la production de cal mais non sur la régénération de tiges. Nos résultats rejoignent donc ceux de ces derniers auteurs, puisque nous n'avons observé aucune différence significative entre les cultivars au niveau du pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables. L'effet génotypique peut, toutefois, être perceptible au niveau d'autres variables. Ainsi, les plantules de laitue romaine provenant des bourgeons apicaux du cultivar SUN ont produit plus de feuilles ($p < 0.01$) que celles issues des autres cultivars de laitue pommée à la 8^e semaine, quel que soit le type d'explantats. Les plantules viables régénérées à partir des bourgeons axillaires du cultivar de laitue pommée ELD ont produit plus de racines ($p < 0.01$) que celles provenant du même type de bourgeons mais des cultivars de laitue pommée EST et ITH, alors qu'il n'y avait pas de différence significative entre la laitue pommée ELD et la romaine SUN pour cette variable. Par ailleurs, les deux laitues pommées ELD et ITH ont montré un repère de ramification racinaire significativement différent, respectivement 0.5 et 1.4 ($p < 0.05$), indépendamment du type de bourgeons. Quoique le repère de ramification racinaire du cultivar de laitue romaine SUN ne soit pas statistiquement différent de celui d'EST et d'ITH, sa valeur (0.6) est plus proche de celle d'ELD (0.5). EST et ITH sont plus résistants à la montaison que SUN et ELD.

Les plantules ayant les plus courtes tiges proviennent du cultivar EST alors que les trois autres cultivars ELD, ITH et SUN ont produit une tige significativement plus longue ($p < 0.05$) à la 8^e semaine. Ces résultats étaient prévisibles dans la mesure où parmi les 4 cultivars étudiés, EST est le plus résistant à la montaison (Jenni et Emery, 2008). Cet effet génotypique oppose donc le cultivar le plus résistant à la montaison à ceux qui y sont sensibles. De plus, la longueur de la tige était fortement et positivement corrélée au nombre

de feuilles (nofe3, $r = 0.64^{****}$; nofe6, $r = 0.62^{****}$; nofe8, $r = 0.76^{****}$) et de boutons floraux (bflo6, $r = 0.68^{****}$; bflo8, $r = 0.82^{****}$) formés par les plantules.

L'indice d'opacité des milieux de culture pour les plantules viables issues de bourgeons apicaux des laitues pommées ELD était près de 3 fois plus élevé ($p < 0.0001$) que celui des cultivars EST et plus de 7 fois supérieur à celui de la romaine SUN. D'autre part la laitue pommée ITH a eu un indice près de 2 fois supérieur à celui de la romaine SUN. Cet indice donne une idée de la quantité de composés phénoliques qui ont été exsudés par les tissus dans le milieu. La forme oxydée des composés phénoliques peut nuire à la croissance de plusieurs façons (Arnaldos *et al.*, 2008). Toutefois, sur une échelle de 0 à 5 les indices d'opacité ne dépassaient 1.5 chez aucun des cultivars, tous types de bourgeons confondus, ce qui est possiblement un niveau trop faible pour nuire à l'organogénèse des tissus. Cette hypothèse semble plausible puisque l'effet cultivar n'est pas significatif pour le pourcentage de régénération des explantats en plantules viables.

En ce qui concerne le deuxième facteur à l'étude, les bourgeons apicaux ont produit des valeurs supérieures à celles des bourgeons axillaires pour plusieurs variables, particulièrement au niveau de la régénération des explantats en plantules viables, cela indépendamment du cultivar. Cette tendance s'est maintenue dans le temps, aux trois périodes de prises de données (aux 3^e, 6^e et 8^e semaines en culture). En effet à la dernière prise de données, les plantules issues de bourgeons apicaux avaient produit 7.7 feuilles ($p < 0.0001$), 2 racines ($p < 0.05$) de plus, une tige plus longue de 6.3 cm ($p < 0.0001$) et avaient un pourcentage d'explantats régénérés plus élevé de 32.5% ($p < 0.0001$), par rapport à celles issues des bourgeons axillaires. Globalement, ces observations sont appuyées par celles du chapitre précédent (paragraphe. 1.3-1.4) indiquant que les explantats de type apicaux avaient une meilleure capacité de régénération que ceux de type axillaire. Ces résultats sont similaires à ceux de Koevary *et al.* (1978).

2.5 CONCLUSION

Certaines différences significatives ont été décelées entre les cultivars, au niveau de variables tant quantitatives que qualitatives du développement *in vitro*. Toutefois, aucun effet du cultivar sur le pourcentage de régénération directe des explantats en plantules viables n'a été constaté. Par contre l'utilisation de bourgeons apicaux favorise grandement la régénération des explantats, possiblement en raison d'une concentration endogène d'hormones. Afin d'éclaircir cet aspect, il serait pertinent d'analyser l'effet des régulateurs de croissance sur la régénération des bourgeons en plantules.

TABLEAU 2.1 Matrice de corrélation de Pearson (n-1)

Variables ^{yz}	nofe3	nofe6	nofe8	tfe3	tfe6	fe3
nofe3	1					
nofe6	0.94****	1				
nofe8	0.88****	0.92****	1			
tfe3	0.86****	0.79****	0.69****	1		
tfe6	0.80****	0.81****	0.77****	0.73****	1	
fe3	0.89****	0.82****	0.71****	0.92****	0.74****	1
fe6	0.74****	0.66****	0.64****	0.82****	0.54**	0.82****
fe8	0.72****	0.65****	0.65****	0.78****	0.53**	0.78****
lgra3	0.67****	0.65****	0.48**	0.78****	0.73****	0.71****
lgra6	0.56**	0.61***	0.49**	0.57**	0.63***	0.63***
plgra3	0.67****	0.53**	0.44*	0.80****	0.62***	0.77****
plgra6	0.21	0.06	0.04	0.36*	0.28	0.28
nora3	0.75****	0.81****	0.69****	0.78****	0.75****	0.71****
nora6	0.25	0.35	0.32	0.18	0.24	0.20
ram6	0.41*	0.32	0.19	0.42*	0.58**	0.49**
ra3	0.26	0.26	0.23	0.31	0.23	0.37*
ra6	0.55**	0.51**	0.61***	0.53**	0.38*	0.53**
ra8	0.60***	0.57**	0.62***	0.60***	0.40*	0.58***
lmra8	0.37*	0.30	0.36*	0.31	0.40*	0.28
ratioRF3	0.61***	0.66**	0.53**	0.82****	0.58***	0.73***
ratioRF6	-0.36*	-0.37*	-0.39	-0.37*	-0.37*	-0.36*
cal3	0.81****	0.78****	0.77****	0.86****	0.68****	0.74****
cal6	-0.31	-0.20	-0.13	-0.48**	-0.26	-0.44*
calb3	0.07	0.01	-0.01	0.07	0.18	-0.05
calb6	0.51**	0.48**	0.59**	0.44*	0.30	0.46**
calv3	0.72****	0.68****	0.69****	0.83****	0.53**	0.74****
calv6	0.26	0.23	0.16	0.43*	0.32	0.40*
io3	0.25	0.21	0.07	0.37*	0.39*	0.36*
io6	0.03	-0.04	-0.12	0.29	0.13	0.23
iopl3	0.34	0.22	0.13	0.30	0.31	0.31
iopl6	-0.45*	-0.45*	-0.51**	-0.24	-0.24	-0.28
mort6	-0.63***	-0.55**	-0.56**	-0.69****	-0.48**	-0.71****
mort8	-0.62***	-0.55***	-0.55**	-0.67****	-0.46**	-0.71****
con3	-0.52**	-0.48**	-0.50**	-0.42*	-0.24	-0.46**
con6	-0.43*	-0.45*	-0.54**	-0.43*	-0.39*	-0.40*
viab3	0.82****	0.75****	0.65****	0.88****	0.71****	0.94****
viab6	0.64****	0.60***	0.67****	0.65****	0.46**	0.65****
viab8	0.66****	0.61***	0.65****	0.67****	0.46**	0.65****
bflo6	0.55**	0.63***	0.64****	0.54**	0.57**	0.45*
bflo8	0.48**	0.49**	0.61***	0.52**	0.50**	0.38*
lgti8	0.64****	0.62***	0.76****	0.58**	0.74****	0.49**

Variables	fe6	fe8	lgra3	lgra6	plgra3	plgra6
nofe3						
nofe6						
nofe8						
tfe3						
tfe6						
fe3						
fe6	1					
fe8	0.97****	1				
lgra3	0.53**	0.48**	1			
lgra6	0.49**	0.52**	0.50**	1		
plgra3	0.67****	0.63***	0.81****	0.43*	1	
plgra6	0.35*	0.35*	0.33	0.01	0.52**	1
nora3	0.52**	0.49**	0.87****	0.59***	0.61***	0.06
nora6	0.22	0.30	0.24	0.66****	0.03	-0.44*
ram6	0.31	0.27	0.55**	0.26	0.60***	0.54**
ra3	0.57**	0.63***	0.25	0.33	0.25	0.22
ra6	0.78****	0.85****	0.24	0.36*	0.36**	0.20
ra8	0.84****	0.90****	0.29	0.40*	0.43*	0.26
lmra8	0.19	0.26	0.37*	0.14	0.35*	0.34
ratioRF3	0.61***	0.56***	0.69****	0.63***	0.58***	0.13
ratioRF6	-0.21	-0.16	-0.26	0.02	-0.30	-0.39*
cal3	0.67****	0.67****	0.61***	0.46**	0.60***	0.16
cal6	-0.20	-0.20	-0.36*	-0.10	-0.47**	-0.57**
calb3	-0.11	-0.11	0.39*	-0.10	0.21	0.19
calb6	0.73****	0.79****	0.11	0.31	0.22	0.08
calv3	0.73****	0.73****	0.39*	0.48**	0.53**	0.16
calv6	0.33	0.27	0.46**	0.28	0.50**	0.41*
io3	0.36*	0.31	0.64****	0.31	0.59***	0.39*
io6	0.39*	0.34	0.39*	0.18	0.48**	0.53**
iopl3	0.27	0.26	0.38*	0.26	0.38*	0.39*
iopl6	-0.21	-0.24	-0.05	-0.05	-0.01	0.28
mort6	-0.88****	-0.89****	-0.44*	-0.33	-0.58***	-0.31
mort8	-0.87****	-0.88****	-0.42*	-0.32	-0.56**	-0.28
con3	-0.58***	-0.61***	-0.09	-0.30	-0.26	-0.07
con6	-0.52**	-0.59***	-0.25	-0.16	-0.25	-0.15
viab3	0.80****	0.77****	0.67****	0.59***	0.72****	0.36*
viab6	0.89****	0.92****	0.34	0.43*	0.46**	0.28
viab8	0.89****	0.94****	0.36*	0.44*	0.49**	0.31
bflo6	0.39*	0.38*	0.47**	0.39*	0.27	0.15
bflo8	0.48**	0.45*	0.39*	0.25	0.39*	0.27
lgti8	0.46**	0.44*	0.55**	0.27	0.55**	0.33

Variables	nora3	nora6	ram6	ra3	ra6	ra8
nofe3						
nofe6						
nofe8						
tfe3						
tfe6						
fe3						
fe6						
fe8						
lgra3						
lgra6						
plgra3						
plgra6						
nora3	1					
nora6	0.44*	1				
ram6	0.29	-0.20	1			
ra3	0.19	0.30	0.21	1		
ra6	0.31	0.37*	0.03	0.74****	1	
ra8	0.37*	0.32	0.04	0.71****	0.94****	1
lmra8	0.30	0.14	0.34	0.27	0.39*	0.31
ratioRF3	0.82****	0.33	0.19	0.20	0.30	0.40
ratioRF6	-0.25	0.57***	-0.33*	0.01	-0.05	-0.14
cal3	0.79****	0.30	0.24	0.14	0.47**	0.56**
cal6	-0.25	0.22	-0.30	-0.02	-0.08	-0.09
calb3	0.35	0.12	0.25	-0.09	-0.11	-0.10
calb6	0.25	0.30	-0.01	0.63***	0.85****	0.85****
calv3	0.58**	0.21	0.12	0.20	0.54**	0.63****
calv6	0.32	0.03	0.29	0.11	0.18	0.15
io3	0.28	-0.00	0.55**	0.33	0.12	0.13
io6	0.07	-0.05	0.28	0.47**	0.29	0.28
iopl3	0.22	-0.01	0.42*	0.34	0.20	0.24
iopl6	-0.32	-0.17	-0.06	0.13	-0.15	-0.15
mort6	-0.40*	-0.18	-0.25	-0.61***	-0.78****	-0.79****
mort8	-0.39*	-0.19	-0.23	-0.60***	-0.78****	-0.79****
con3	-0.24	-0.23	0.10	-0.31	-0.65****	-0.65****
con6	-0.36*	-0.14	-0.14	-0.45*	-0.66****	-0.57**
viab3	0.65****	0.15	0.46**	0.51**	0.62***	0.64****
viab6	0.41*	0.30	0.13	0.69****	0.95****	0.94****
viab8	0.43*	0.31	0.11	0.66****	0.93****	0.98****
bflo6	0.60***	0.23	-0.04	0.08	0.36*	0.37*
bflo8	0.49**	0.13	-0.01	0.10	0.46**	0.46**
lgti8	0.58***	0.10	0.28	0.11	0.46**	0.41*

Variables	lmra8	ratioRF3	ratioRF6	cal3	cal6	calb3
nofe3						
nofe6						
nofe8						
tfe3						
tfe6						
fe3						
fe6						
fe8						
lgra3						
lgra6						
plgra3						
plgra6						
nora3						
nora6						
ram6						
ra3						
ra6						
ra8						
lmra8	1					
ratioRF3	0.09	1				
ratioRF6	-0.10	-0.26	1			
cal3	0.22	0.71****	-0.31	1		
cal6	-0.43*	-0.28	0.34	-0.32	1	
calb3	0.34	-0.03	0.01	0.27	-0.24	1
calb6	0.08	0.22	-0.09	0.53**	0.06	-0.05
calv3	0.07	0.72****	-0.31	0.90****	-0.29	-0.11
calv6	0.44*	0.43*	-0.00	0.09	-0.45*	-0.12
io3	0.12	0.25	-0.11	0.03	-0.08	0.01
io6	0.21	0.28	-0.01	-0.05	-0.27	0.01
iopl3	0.27	0.15	-0.12	0.08	-0.08	0.06
iopl6	0.05	-0.09	0.01	-0.52**	-0.15	-0.07
mort6	-0.30	-0.47**	0.22	-0.54**	0.16	0.10
mort8	-0.31	-0.45*	0.22	-0.53**	0.17	0.12
con3	-0.02	-0.22	0.02	-0.46**	0.15	0.09
con6	-0.26	-0.27	0.15	-0.49**	0.09	-0.10
viab3	0.28	0.67****	-0.35*	0.69****	-0.47**	-0.03
viab6	0.31	0.42*	-0.09	0.57**	-0.14	-0.11
viab8	0.28	0.46**	-0.17	0.63***	-0.14	-0.07
bflo6	0.20	0.58**	-0.22	0.52**	-0.24	-0.01
bflo8	0.18	0.51**	-0.19	0.56**	-0.16	0.07
lgti8	0.49**	0.41*	-0.26	0.59***	-0.22	0.21

Variables	calb6	calv3	calv6	io3	io6	iopl3
nofe3						
nofe6						
nofe8						
tfe3						
tfe6						
fe3						
fe6						
fe8						
lgra3						
lgra6						
plgra3						
plgra6						
nora3						
nora6						
ram6						
ra3						
ra6						
ra8						
lmra8						
ratioRF3						
ratioRF6						
cal3						
cal6						
calb3						
calb6	1					
calv3	0.59***	1				
calv6	-0.26	0.12	1			
io3	-0.02	-0.03	0.39*	1		
io6	0.07	0.00	0.48**	0.62***	1	
iopl3	0.13	0.06	0.20	0.41*	0.19	1
iopl6	-0.35	-0.43	0.30	0.36*	0.73***	-0.02
mort6	-0.64****	-0.59***	-0.29	-0.33	-0.38*	-0.27
mort8	-0.64****	-0.58**	-0.28	-0.31	-0.38*	-0.21
con3	-0.63***	-0.54**	-0.09	0.11	-0.01	-0.10
con6	-0.61***	-0.46**	-0.05	0.01	-0.03	0.07
viab3	0.53**	0.72****	0.38*	0.34	0.31	0.41*
viab6	0.87****	0.64****	0.24	0.17	0.31	0.23
viab8	0.85****	0.69****	0.20	0.15	0.28	0.25
bflo6	0.25	0.47**	0.33	0.23	0.21	-0.08
bflo8	0.36*	0.54***	0.34	0.18	0.26	-0.04
lgti8	0.29	0.46**	0.42*	0.28	0.16	0.12

Variables	iopl6	mort6	mort8	con3	con6	viab3
nofe3						
nofe6						
nofe8						
tfe3						
tfe6						
fe3						
fe6						
fe8						
lgra3						
lgra6						
plgra3						
plgra6						
nora3						
nora6						
ram6						
ra3						
ra6						
ra8						
lmra8						
ratioRF3						
ratioRF6						
cal3						
cal6						
calb3						
calb6						
calv3						
calv6						
io3						
io6						
iopl3						
iopl6	1					
mort6	0.18	1				
mort8	0.18	0.99****	1			
con3	0.25	0.54**	0.54**	1		
con6	0.36*	0.59***	0.60***	0.30	1	
viab3	-0.17	-0.70****	-0.69****	-0.52**	-0.41*	1
viab6	-0.18	-0.78****	-0.78****	-0.68****	-0.64****	0.71****
viab8	-0.21	-0.82****	-0.81****	-0.71****	-0.61***	0.70****
bflo6	0.03	-0.27	-0.27	-0.24	-0.31	0.45*
bflo8	0.04	-0.33	-0.32	-0.40*	-0.36*	0.42*
lgti8	-0.13	-0.40*	-0.39*	-0.29	-0.47**	0.49**

Variables	viab6	viab8	bflo6	bflo8	lgti8
nofe3					
nofe6					
nofe8					
tfe3					
tfe6					
fe3					
fe6					
fe8					
lgra3					
lgra6					
plgra3					
plgra6					
nora3					
nora6					
ram6					
ra3					
ra6					
ra8					
lmra8					
ratioRF3					
ratioRF6					
cal3					
cal6					
calb3					
calb6					
calv3					
calv6					
io3					
io6					
iopl3					
iopl6					
mort6					
mort8					
con3					
con6					
viab3					
viab6	1				
viab8	0.96****	1			
bflo6	0.42*	0.40*	1		
bflo8	0.54**	0.50**	0.82****	1	
lgti8	0.51**	0.46**	0.68****	0.82****	1

^znofe3= Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 3^e semaine; nofe6 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; nofe8 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 8^e semaine; tfe3 = Longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule à la 3^e semaine, tfe6 = Longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule à la 6^e semaine; fe3 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 3^e semaine; fe6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; fe8 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 8^e semaine; nora3 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 3^e semaine; nora6 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; ram6 = Repère de ramification racinaire (0 = aucune ramification et 3 = très ramifié) à la 6^e semaine; ra3 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 3^e semaine; ra6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ra8 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 8^e semaine; lmra8 = Longueur de la masse racinaire de la plantule (en cm) à la 8^e semaine (distance (en cm) entre le collet et 95 % de la masse racinaire); ratioRF3 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 3^e semaine; ratioRF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine; cal3 = Diamètre maximal (en mm) du cal, à la base des tiges à la 3^e semaine; cal6 = Diamètre maximal (en mm) du cal, à la base des tiges à la 6^e semaine; calb3 = Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 3^e semaine; calb6 = Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 6^e semaine; calv3 = Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 3^e semaine; calv6 = Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 6^e semaine; io3 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 3^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); io6 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); iopl3 = Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 3^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); iopl6 = Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); mort6 = Pourcentage de mortalité

à la 6^e semaine; mort8 = Pourcentage de mortalité à la 8^e semaine; con3 = Pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 3^e semaine (0 = absence de contamination et 1 = présence de contamination); con6 = Pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 6^e semaine (0 = absence de contamination et 1 = présence de contamination); viab3 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 3^e semaine; viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 6^e semaine; viab8 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 8^e semaine; bflo6 = Nombre de boutons floraux produits par les plantules à la 6^e semaine; bflo8 = Nombre de boutons floraux produits par les plantules à la 8^e semaine; lgti8 = Longueur de la tige de la plantule (en cm) à la 8^e semaine;.

^{y*}, **, ***, **** significatif à $p < 0.05$; 0.01; 0.001 et 0.0001 respectivement.

TABLEAU 2.2. Anova à deux facteurs, cultivar et type de bourgeon

Variables ^{yz}	nofe8	nor6	ram6	calb3	iopl6	viab3	viab6	viab8	lgti8
<i>Types de bourgeon</i>									
Apical	14.1	15.8	1.2	2.5	0.8	48.1	80.7	83.1	13.4
Axillaire	6.4	13.8	0.7	6.3	1.0	1.3	45.0	50.6	7.1
<i>Cultivars</i>									
Eldorado	8.4	17.6	0.5 ^b	2.5	1.3	22.5	65.0	68.8	10.0 ^a
Estival	8.4	11.7	1.3 ^{ab}	0	0.7	27.5	50.0	55.0	5.6 ^b
Ithaca	10.1	12.6	1.4 ^a	2.5	0.9	27.5	63.8	67.5	12.6 ^a
Sunbelt	14.2	17.2	0.6 ^{ab}	12.5	0.5	21.3	72.5	76.3	12.8 ^a
<i>Effets significatifs^x</i>									
Cultivar	****	*	*	NS	****	NS	NS	NS	***
Bourgeon	****	NS	*	NS	NS	****	****	****	****
Cultivar * Bourgeon	**	**	NS	NS	**	NS	NS	NS	*

^z nofe8 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 8^e semaine; nor6 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; ram6 = Repère de ramification racinaire (0 = aucune ramification et 3 = très ramifié) à la 6^e semaine; calb3 = Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 3^e semaine; iopl6 = Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (0 = milieu presque transparent à 5 = milieu opaque); viab3 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm) à la 3^e semaine en culture; viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 6^e semaine en culture; viab8 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 8^e semaine en culture; lgti8 = Longueur de la tige de la plantule (en cm) à la 8^e semaine (distance entre le collet et la cime).

^yLes variables ayant des lettres différentes en exposant sont considérées comme significativement différentes selon Tukey ($\alpha = 0.05$).

*NS, *, **, ***, **** non significatif ou significatif à $p < 0.05$; 0.01; 0.001 et 0.0001 respectivement.

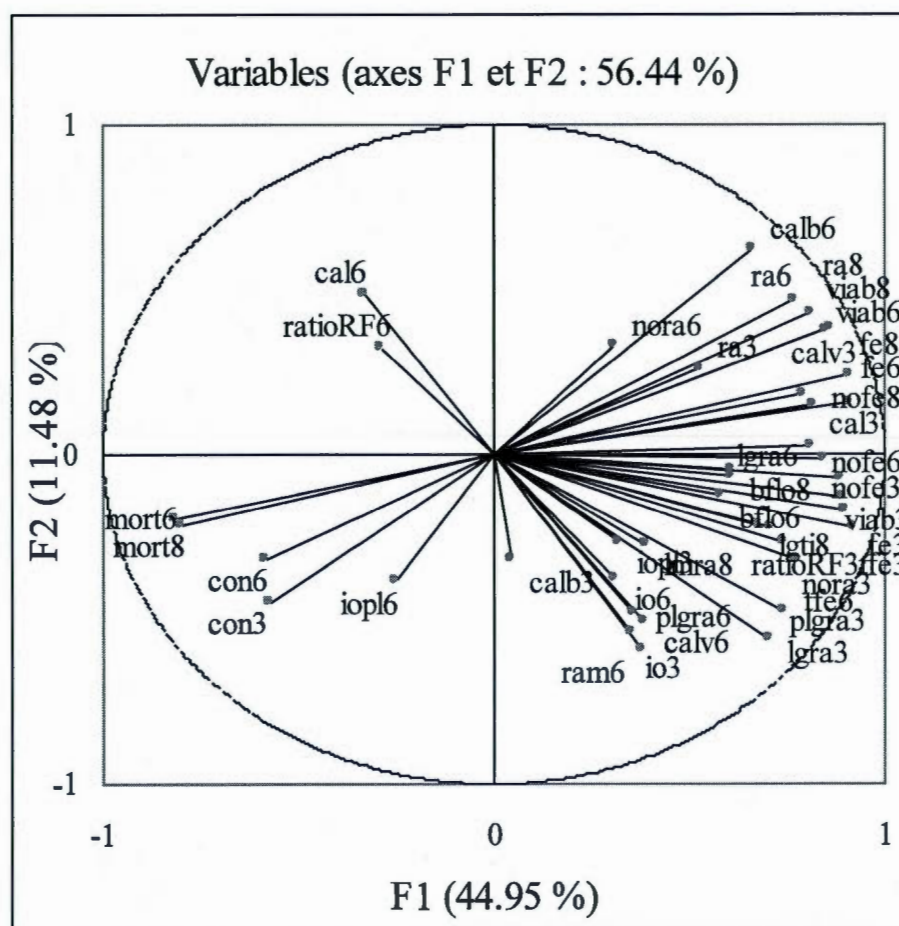


FIGURE 2.1 Analyse en composantes principales effectuée sur les variables mesurées pour évaluer l'effet génotypique sur la régénération des explantats.

Nofe3, nofe6 et nofe8 = nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules viables, tfe3 et tfe6 = longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule, fe3, fe6 et fe8 = pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm), nora3 et nora6 = nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules viables, ram6 = repère de ramification racinaire (0 = absence de ramification et 3 = très ramifiées), ra3, ra6 et ra8 = pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm), lmra8 = longueur de la masse racinaire de la plantule (en cm), ratioRF3 et ratioRF6 =

[nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable], cal3 et cal6 = diamètre maximal du cal (en mm), calb3 et calb6 = pourcentage de cal brun, calv3 et calv6 = pourcentage de cal vert, io3 et io6 = indice d'opacité du milieu de culture (0 = milieu translucide à 5 = milieu très opaque), iopl3 et iopl6 = indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque), mort6 et mort8 = pourcentage de mortalité, con3 et con6 = pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube, viab3, viab6 et viab8 = pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins 1 racine et une feuille ≥ 1 cm), bflo6 et bflo8 = nombre de boutons floraux, lgti8 = longueur de la tige de la plantule (en cm). Ces variables ont été relevées à la fin des 3^e, 6^e et 8^e semaines en culture, dépendamment du chiffre qui suit l'abréviation de la variable.

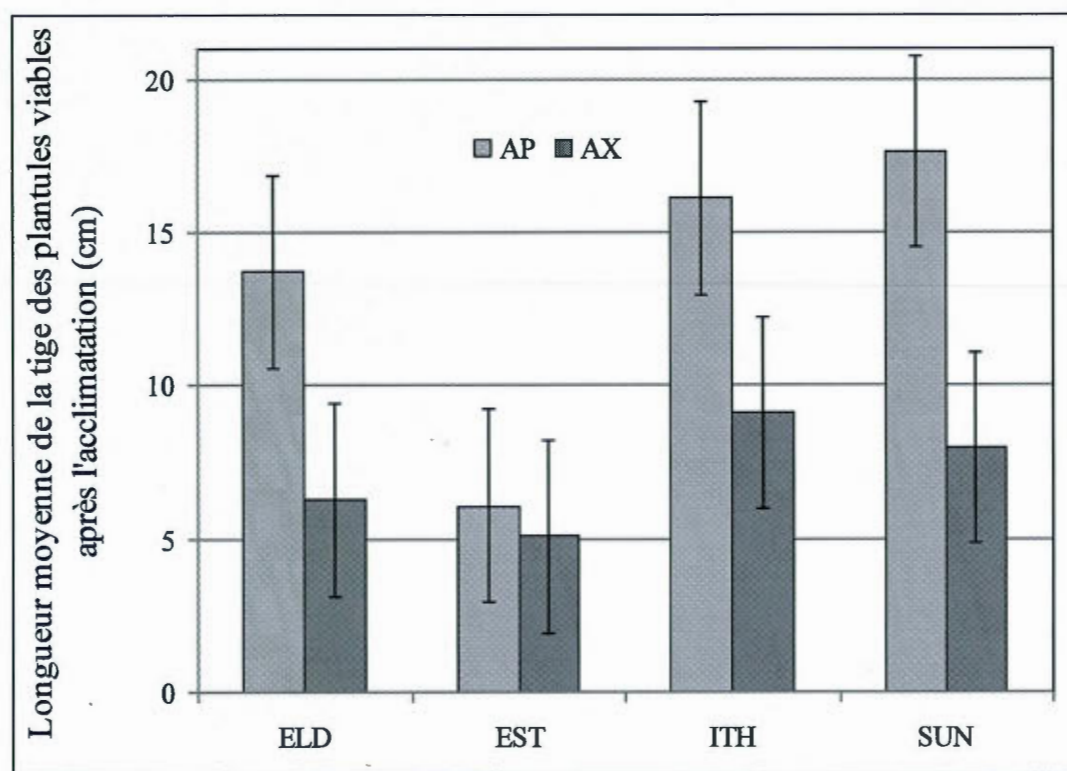


FIGURE 2.2 Longueur moyenne de la tige (distance entre le collet et la cime) des plantules viables (en cm) pour chacun des cultivars (Eldorado, Estival, Ithaca et Sunbelt) à la 8^e semaine. AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

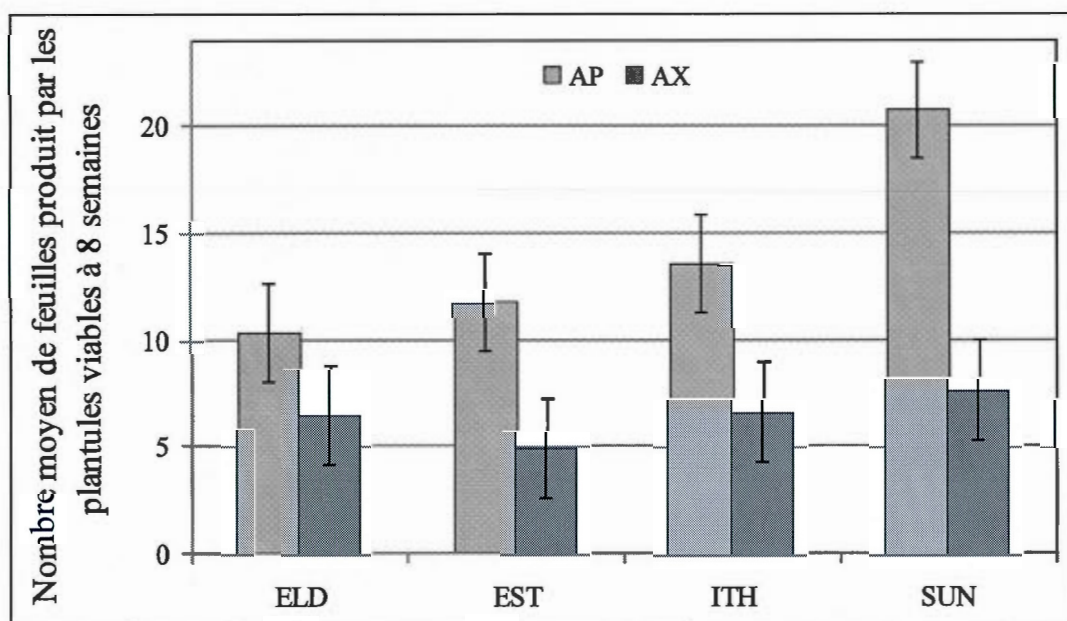


FIGURE 2.3 Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules viables, pour chacun des cultivars (Eldorado, Estival, Ithaca et Sunbelt) et en fonction du type d'explantats après l'acclimatation (à la 8^e semaine). AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

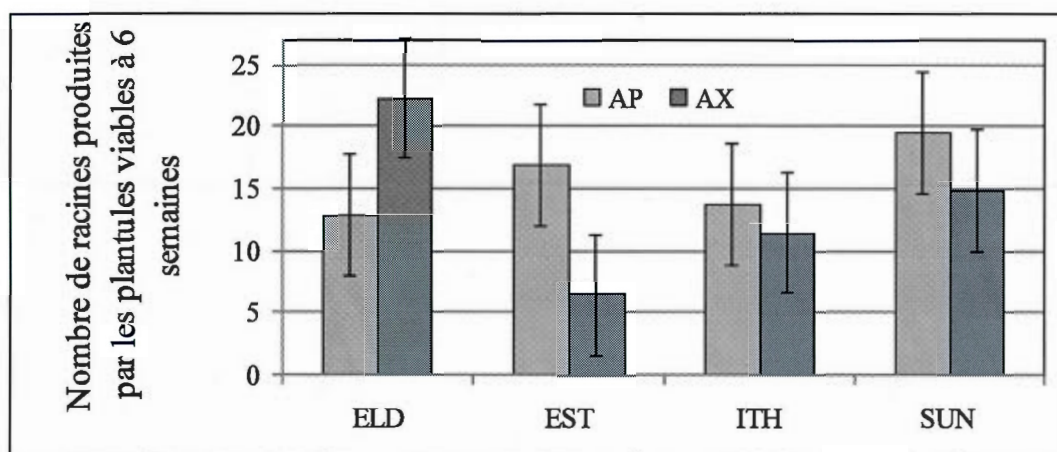


FIGURE 2.4 Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules viables, pour chacun des cultivars (Eldorado, Estival, Ithaca et Sunbelt) et en fonction du type d'explantats à la 6^e semaine *in vitro*. AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

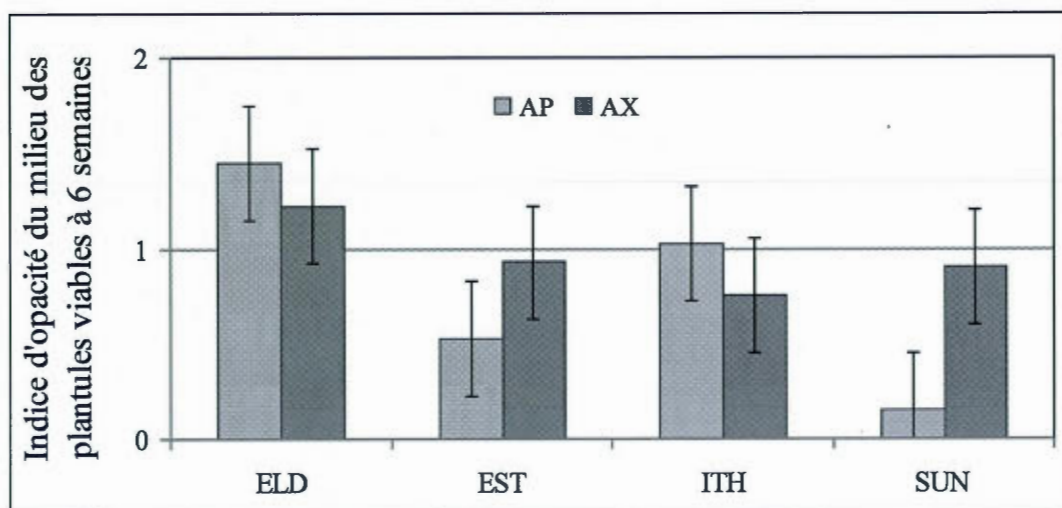


FIGURE 2.5 Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables, en réponse à l'exsudation de composés phénoliques par les plantules (0 = milieu clair, 5 = milieu très opaque), pour chacun des cultivars (Eldorado, Estival, Ithaca et Sunbelt) et en fonction du type d'explantats à la 6^e semaine *in vitro*. AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

2.6 BIBLIOGRAPHIE

- Addinsoft 2007. XLSTAT software. Release 2007. New York, NY, Addinsoft U.S.A
- Ampomah-Dwamena C., J.A. Conner et G.A. Fautrier. 1997. «Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration in vitro». *Scientia Horticulturae*, vol. 71, p. 137-145.
- Arnaldos T.L., R. Munoz, M.A. Ferrer et A.A. Claderon. 2008. «Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) callus culture». *Physiologia Plantarum*, vol. 113, no 3, p. 315 - 322.
- Avila S., M. Tony, Mederos et Adolfo (2005). Romain lettuce variety named Sunbelt. United States Patent. United States Patent. U.S.A, Central Valley Seeds. 6841723
- Bloksberg L.N. et M.E.J. Salveit. 1986. «Regeneration of plants from axillary buds of harvested and stored heads of field-grown Iceberg lettuce». *Hortscience*, vol. 21, no 5, p. 1201-1203.
- Brown C., J.A. Lucas, I.R. Crute, G.A. Walkey et J.B. Power. 1986. «An assessment of genetic variability in somacloned lettuce plants (*Lactuca sativa*) and their offspring». *Annals of Applied Biology* vol. 109, p. 391- 407.
- Dupont S.M., Z. Mondin, G. Williamson et K.R. Price. 2000. «Effect of variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, p. 3957-3964.
- Georges E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture Part: 1 The Technology*. England: Exegetics Ltd, 573 p.
- Hunter D.C. et D.J. Buritt. 2002. «Improved adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.)». *Scientia Horticulturae*, vol. 95, no 2002, p. 269-276.
- Jenni S. et G.C. Emery. 2008. «Estival lettuce». *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 89, no 1, p. 99-101.
- Koevary K., L. Rappaport et L.L. Morris. 1978. «Tissue culture propagation of head lettuce.». *Hortscience*, vol. 13, no 1, p. 39-41.
- Mohebodini M., M.J. Javaran, F. Mahboudi et H. Alizadeh. 2011. «Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of Lettuce (*Lactuca sativa* L.)». *Australian Journal of Crop Science*, vol. 5, no 1, p. 92-95.
- Murashige T. et F. Skoog. 1962. «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures». *Plant Physiology*, vol. 15, p. 473-497.

SAS Institute Inc. 1999. *The SAS system for Windows*, Release 8.2. Cary, N.C.: SAS Institute

Webb D.T., L.D. Torres et P. Fobert. 1984. «Interaction of growth regulators, explant age, and culture environment controlling organogenesis from lettuce cotyledons *in vitro*». *Canadian Journal of Botany*, vol. 62, p. 586-590.

Wehner T.C. 2002. «Vegetable cultivar descriptions for North America. List 26». *Hortscience*, vol. 37, p. 15-78.

CHAPITRE III

RÉGÉNÉRATION *IN VITRO* DE BOURGEONS DE LAITUE (*LACTUCA SATIVA* L.) EN PRÉSENCE DE DIFFÉRENTES COMBINAISONS D'AIA ET DE BAP

RÉSUMÉ

L'utilisation de bourgeons apicaux pour la régénération directe de plantules de laitue (*Lactuca sativa* L.) en culture *in vitro* permet la préservation des génotypes d'intérêt sélectionnés dans le cadre de programmes d'amélioration génétique. La mise en culture des explantats a été faite sur des milieux nutritifs contenant différentes combinaisons d'acide 3-indoleacétique (AIA : 0 μ M, 0.49 μ M, 2.46 μ M et 7.38 μ M) et de 6-benzylaminopurine (BAP : 0 μ M, 0.44 μ M, 4.44 μ M). Les concentrations d'AIA utilisées n'ont pas eu d'effets significatifs sur la régénération des explantats en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm). De plus, le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) (92 - 22.3%, $p < 0.0001$), le repère de ramification racinaire (2.5 - 0, $p < 0.0001$), le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (92 - 22.3 %, $p < 0.0001$) et le ratio nombre total de racines/nombre total de feuille produites par plantule viable (0.8 - 0.2, $p < 0.0001$) ont diminué avec la concentration de BAP présente dans le milieu. La régénération complète des explantats en plantules de laitue viables, issues de bourgeons apicaux, peut se faire (50.0 - 60.7 %) sur un milieu de culture contenant uniquement de l'AIA à une faible concentration (0.49 - 7.38 μ M).

MOTS CLÉS

Lactuca sativa L., *in vitro*, culture de bourgeons, hormone de croissance, auxine, cytokinine, AIA, BAP.

3.1 INTRODUCTION

Au cours des cinq dernières décennies le rôle des auxines et cytokinines, hormones très impliquées dans la croissance et le développement des plantes, a surtout été étudié pour tenter de comprendre le phénomène de la dominance apicale. La capacité de mesurer des concentrations endogènes d'hormones a beaucoup évolué, en raison de l'apparition de nouveaux outils biotechnologiques telles les plantes transgéniques. Elle a permis, par exemple, la mise en évidence du rôle important de l'auxine et de la cytokinine dans le développement des bourgeons axillaires (Cline, 1994). Dès 1957, Skoog et Miller ont avancé l'hypothèse que l'initiation de tiges et de racines à partir de cals en culture peut être régulée par un ratio d'auxine et de cytokinine. Ces auteurs ont observé qu'un ratio élevé auxine/cytokinine engendrait la formation de racines chez les cals de tabac, alors qu'un faible ratio des mêmes hormones favorisait la formation de tiges. En somme, deux voies s'ouvrent à la cellule végétale indifférenciée : elle peut grandir, se diviser, puis grandir et se diviser à nouveau, ou bien elle peut s'allonger sans se diviser. Les cellules qui se divisent de façon répétée restent essentiellement indifférenciées, méristématiques, alors que celles qui s'allongent, dans la majorité des cas finissent par se spécialiser (Salisbury et Ross, 1992) et éventuellement former une plante entière. D'où la grande utilisation de ces deux hormones en culture *in vitro*.

L'objectif de cette expérience était d'identifier la concentration optimale d'une auxine, l'AIA et d'une cytokinine, la BAP pouvant induire la régénération de bourgeons apicaux de laitue en plantules viables. Pour ce faire, les explantats ont été prélevés sur des cœurs de laitue (*Lactuca sativa* L.) et ont été mis en culture sur un substrat renfermant différentes concentrations de ces hormones. La régénération de bourgeons de laitue a déjà été rapportée avec l'AIA, l'AIB, la kinétine et la BAP (Koevary *et al.*, 1978; Bloksberg et Salveit, 1986; Pink et Carter, 1987; Jenni *et al.*, 2006). Toutefois, le développement racinaire était imprévisible et nécessitait parfois le transfert sur un milieu d'enracinement (Koevary *et al.*, 1978). Pour simplifier les étapes de régénération, nous visons à identifier un seul milieu favorisant à la fois le développement des feuilles et des racines.

3.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

3.2.1 Matériel végétal

Les plants de laitue pommée (*Lactuca sativa* L.), qui appartiennent au même lot et sont issus d'un même cultivar, proviennent de la compagnie TKM, Bengard Frams, LLC (Californie). Ils ont été récoltés la même journée et ont été livrés au Centre de recherche d'Agriculture et Agroalimentaire Canada de Saint-Jean-sur-Richelieu 5 jours après la récolte (soit le 24 avril 2010). Les cœurs ont été entreposés à 2 °C pendant 2, 3, 4 et 7 jours de plus, correspondant respectivement aux répétitions 1, 2, 3 et 4, avant l'extraction des explantats pour la mise en culture.

3.2.2 Prélèvement, aseptisation et excision des explantats

Au moment de la récolte des laitues, les cœurs n'avaient pas de bourgeons axillaires visibles et seuls les bourgeons apicaux ont été prélevés. Chaque bourgeon apical fut mesuré à l'aide d'un vernier (Electronic digital caliper 200 mm, Marathon Management Company); leur longueur variait entre 3.47 et 5.32 mm et leur largeur entre 2.72 et 4.41 mm. Les bourgeons apicaux ainsi que leurs tissus sous-jacents ont été extraits à l'aide d'un emporte-pièce en cuivre de 1 cm de large et 2.5 cm de long. Les explantats furent aseptisés par immersion avec agitation dans de l'hypochlorite de sodium à 1.8 % de concentration, auquel une goutte de Tween 80 (Fisher Scientific BP338-500) par 100 ml a été ajoutée, pendant 10 minutes. Ils ont subi trois rinçages successifs de 5 minutes chacun dans de l'eau nanopure stérile (autoclavée pendant 20 minutes à 103.3 kPa et 121 °C). Avant la mise en culture, les explantats ont été taillés selon une coupe diamant laissant 6 mm de tissus sous-jacents, afin d'enlever les couches de tissus endommagés au cours de l'étape d'aseptisation. Cette opération a été effectuée en conditions stériles, dans une goutte de solution anti-oxydante. Cette dernière était composée de 0.02 g d'acide L-ascorbique (Sigma C-4540) préalablement dissous dans une goutte d'éthanol, combiné à 0.03 g d'acide citrique anhydre (Sigma A-2174) préalablement dissous dans du NaOH 1 M. Après la dissolution complète des sels, la solution a été stérilisée à l'aide d'un filtre (0.22 µm), puis le volume fut complété à 200 ml avec de l'eau nanopure autoclavée, pour une concentration finale de 568 µM d'acide ascorbique et 52 µM d'acide citrique anhydre.

3.2.3 Milieu de culture

Les explantats ont été mis en culture sur un milieu de base Murashige et Skoog (1962) renfermant du saccharose (30 g/l) et de l'agar (8 g/l de type Bacto, Sigma M9274). Différentes concentrations d'acide 3-indoleacétique ou AIA (Sigma i2886) et de 6-benzylaminopurine ou BAP (Sigma B3408) ont été ajoutées, soit 0 μM , 0.49 μM , 2.46 μM et 7.38 μM d'AIA et 0 μM , 0.44 μM et 4.44 μM de BAP.

Une fois le pH ajusté à 5.7, le milieu nutritif fut versé dans des tubes de 25 x 150 mm (12 ml/tube) scellés avec des bouchons Kim Kap et le tout stérilisé à l'autoclave à 103.3 kPa et 121 °C, pendant 20 minutes. Les explantats ont été insérés dans le milieu jusqu'à la base du bourgeon, immergeant ainsi tout le parenchyme sous-jacent à celui-ci. Aucun des explantats n'a été repiqué ou acclimaté au cours de cette expérience. Ils ont été maintenus sur ce milieu de culture pendant 6 semaines.

3.2.4 Conditions environnementales dans la chambre de culture *in vitro*

La température moyenne était de 12 °C la nuit et 16 °C le jour. La photopériode de 16 heures à 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ a été assurée par des néons de 48'', 40 W (F40/ agro de Philips, Wesco, Saint-Jean-sur-Richelieu).

3.2.5 Dispositif expérimental

L'expérience a été conçue sous forme de plan factoriel complet. Ce dernier comprenait 2 facteurs et 4 blocs répétitifs, complétés à raison d'un bloc par jour. Chacun des blocs comptait 84 individus représentant chacun un essai. Les explantats ont été répartis de façon aléatoire dans les blocs. Le bilan des traitements est le suivant : 4 concentrations d'AIA x 3 concentrations de BAP x 7 tubes par traitement (unité expérimentale) = 84 tubes par répétition x 4 = 336 tubes ou explantats.

3.2.6 Variables mesurées

Afin de comparer les différents traitements, un certain nombre de variables quantitatives et qualitatives ont été relevées à la 6^e semaine en culture. Le chiffre des codes fait référence à la semaine de culture pendant laquelle le relevé a été effectué. Les variables qualitatives sont évaluées comme l'absence (0) ou la présence (1) du phénomène indiqué, ou

son ampleur (de 0 à 5) (cf liste des abréviations). Les données ont été prises en suivant les paramètres suivants.

Les variables quantitatives comprenaient : nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites (nofe6), longueur de la plus longue feuille (tfe6, en mm), nombre de racines (≥ 1 cm) produites (nora6), somme des longueurs de toutes les racines (≥ 1 cm) produites (lgra6, en mm), longueur atteinte par la plus longue racine (plgra6, en mm), diamètre maximal du cal à la base des tiges (cal6, en mm), nombre de boutons floraux (bflo6), largeur du bourgeon (en mm) avant le prélèvement (larb), longueur du bourgeon (en mm) du point d'insertion jusqu'au sommet avant prélèvement (lgb), pourcentage de cals de type vert produit à la base des tiges (calv6), pourcentage de cals de type brun produit à la base des tiges (calb6), pourcentage de mortalité (mort6), pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube (con6), pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (viab6 : 0 = absence de feuille et/ou de racine ≥ 1 cm et 1 = présence d'au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine (fe6), pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine (ra6), [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine (ratioRF6).

Les variables qualitatives comprenaient : repère de ramification racinaire (ram6 : 0 = aucune ramification et 3 = système racinaire très ramifié), indice d'opacité du milieu de culture (io6 : 0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) et indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque).

Les pourcentages de mortalité, de contamination, de régénération en plantules viables, d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) et d'au moins une racine (≥ 1 cm), ainsi que l'indice d'opacité du milieu de culture, ont été relevés sur l'ensemble des tubes et calculés par rapport au nombre initial d'explantats mis en culture. Les autres variables ont été relevées sur les plantules viables régénérées et leurs pourcentages établis par rapport à ces dernières.

3.2.7 Analyse statistique

Dans un premier temps, une analyse en composantes principales (ACP) a été faite en utilisant le logiciel de traitement de données XLSTAT (Addinsoft, 2007) afin d'identifier les variables corrélées entre elles (analyse du coefficient de corrélation de Pearson) et de sélectionner, parmi les variables mesurées pour les différentes concentrations d'hormones, un sous-ensemble de variables pour les analyses subséquentes.

Par la suite une analyse de variance a été effectuée, en utilisant la procédure GLM (SAS Institute Inc, 1999), permettant ainsi la mise en évidence des différences significatives entre les traitements auxine (AIA), cytokinine (BAP), ainsi que leurs interactions.

Le modèle linéaire a été ajusté, pour chacune des répétitions, en faisant la moyenne des variables numériques et le pourcentage des variables binaires. Au besoin, certaines données ont été transformées, par la fonction racine carrée et logarithmique, pour satisfaire à l'homogénéité de variances, ainsi qu'à l'homoscédasticité et la normalité de distribution des résidus. Ces valeurs ont été représentées graphiquement à l'aide de barres représentant 95 % de l'intervalle de confiance.

3.3 RÉSULTATS

Les deux premiers axes F1 et F2 de l'ACP (fig.3.1) expliquent 55.6 % de la variabilité ($p < 0.001$) des paramètres à l'étude. Des corrélations significatives ont été mises en évidence à l'égard des variables mesurées sur l'état de santé des plantules (tabl. 3.1) : le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables 'viab6' était négativement corrélé au pourcentage de plantules mortes 'mort6' ($r = -0.33^*$) ainsi qu'au pourcentage de contamination 'con6' ($r = -0.31^*$), mais positivement corrélé au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille ($\geq 1\text{cm}$) 'fe6' ($r = 0.33^*$). La variable 'viab6' a été conservée pour les analyses subséquentes car elle était importante pour ce projet de recherche.

Pour ce qui est des variables mesurées sur les feuilles, le nombre moyen de feuilles par plantule viable 'nofe6' était fortement et positivement corrélé à la longueur de la plus longue feuille de la plantule 'tfe6' ($r = 0.70^{****}$), ainsi qu'au diamètre maximal du cal à la base des tiges des plantules viables 'cal6' ($r = 0.75^{****}$). La variable 'nofe6' a été préservée pour l'analyse subséquente afin de quantifier la régénération foliaire des plantules. Le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille ($\geq 1\text{cm}$) 'fe6' n'a pas été conservé car le modèle n'était pas significatif.

Parmi les variables caractérisant les racines, le repère de ramification racinaire 'ram6' était fortement et positivement corrélé au nombre de racines 'nora6' ($r = 0.63^{****}$), à la plus longue racine de la plantule 'plra6' ($r = 0.78^{****}$), à la somme des longueurs (en mm) de toutes les racines de la plantule 'lgra6' ($r = 0.77^{****}$), et d'autre part faiblement et négativement corrélé à la quantité de boutons floraux produits par les plantules 'bflo6' en fin d'expérience ($r = -0.32^*$). La variable 'ram6' a été conservée pour caractériser la qualité du système racinaire engendré par chacun des traitements. Le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine ($\geq 1\text{cm}$) 'ra6' a été conservé pour identifier les traitements favorisant une plus forte organogénèse racinaire. Le 'ratioRF6' a été conservé pour quantifier la proportion de racines par rapport au nombre de feuilles au moment de l'acclimatation.

Il existait une relation significative et intéressante entre les variables qui mesurent les caractéristiques du cal, du bourgeon avant le prélèvement et l'indice d'opacité du milieu de

culture. En effet, le cal de type vert 'calv6' avait une corrélation positive avec la largeur du bourgeon 'larb' ($r = 0.46^{**}$). On retrouvait encore une corrélation positive entre la variable 'calv6' et la longueur du bourgeon avant son prélèvement, mais plus faible ($r = 0.31^*$). La relation entre 'calb6' et 'larb' ($r = -0.40^{**}$) ainsi qu'entre 'calb6' et 'lgb' ($r = -0.20$) était négative, quoique non significative pour cette dernière. Dans le même ordre d'idée, l'indice d'opacité du milieu de culture 'io6' était fortement corrélé à 'calb6' ($r = 0.51^{***}$) et 'calv6' ($r = -0.66^{****}$). D'autre part 'io6' était aussi corrélé à l'indice d'opacité de milieu de culture des plantules viables 'iopl6' ($r = 0.68^{****}$), à 'larb' ($r = -0.41^{**}$) et à 'lgb' ($r = -0.35^*$). Seul l'indice d'opacité du milieu de culture 'io6' a été conservé pour l'anova, afin que nous puissions mieux comprendre les effets du brunissement du milieu sur la régénération.

Les regroupements ci-dessus ont permis d'identifier la variable la plus représentative parmi celles qui sont corrélées entre elles, ce qui a grandement facilité les analyses statistiques et l'interprétation de données. Lors de la sélection nous avons d'abord priorisé les variables quantitatives. Ensuite, les paramètres faisant référence à des organes différents ont été sélectionnés pour enrichir l'analyse globale de l'expérience (nofe6, ram6). Viab6 a été conservée car c'est la variable clé de l'expérience. Io6 a été retenue parce qu'elle était fortement corrélée de façon négative à la précédente ($r = -0.65^{****}$) de même que ram6 ($r = -0.73^{****}$), car elle constitue la seule variable évaluant le développement racinaire pour lequel on observait un effet de l'AIA, bien que sous forme d'interaction avec la BAP. Les autres ont simplement été mises de côté pour éviter la redondance de l'information. Après ce tri, six variables ont été retenues pour les analyses de variance, il s'agit de nofe6, ra6, ram6, ratioRF6, io6, viab6.

L'interaction (tabl.3.2) entre les concentrations de BAP et d'AIA était significative chez trois des variables retenues : le repère de ramification racinaire (ram6, $p < 0.01$), le ratio nombre total de racines ($\geq 1\text{cm}$)/nombre total de feuilles ($\geq 1\text{cm}$) produites par plantule viable (ratioRF6, $p < 0.05$), ainsi que l'indice d'opacité du milieu de culture (io6, $p < 0.05$). Les autres variables retenues (tabl.3.2), à savoir le nombre de feuilles (nofe6), le pourcentage ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine ($\geq 1\text{cm}$) (ra6) et le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (viab6), ne présentaient pas d'interactions significatives. Les effets principaux ont alors été utilisés pour comparer les résultats de ces variables.

Les moyennes des variables ont été présentées pour chacun des traitements. Les différences significatives entre les effets ont été identifiées à l'aide du test de Tukey (les moyennes ayant les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes).

Le traitement à la BAP a eu une influence sur toutes les variables qui ont été étudiées (tabl. 3.2). Le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables à la 6^e semaine diminuait significativement avec l'augmentation de la concentration de BAP dans le milieu de culture. En effet, la régénération des explantats (tabl.3.2) était plus élevée (92.0 %) dans un milieu de culture qui ne contenait pas de BAP. De la même manière, le pourcentage ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine ≥ 1 cm (tabl.3.2) diminuait avec l'augmentation de la concentration en BAP (92% à 0 μ M et 22.3% à 4.44 μ M). Par contre, le nombre moyen de feuilles ≥ 1 cm par plantule (tabl.3.2) était plus élevé en présence d'une faible concentration de BAP (14.4 à 0.44 μ M) qu'en son absence (9.6 à 0 μ M), sans être significativement différent des deux cas à plus forte concentration (11 à 4.44 μ M).

Pour toutes les concentrations d'AIA, le repère de ramification racinaire (fig.3.2) était plus élevé en absence de BAP qu'en sa présence. En absence de BAP (0.0 μ M), les racines étaient moins ramifiées qu'en présence d'une forte concentration d'AIA (7.38 μ M), mais sans différences significatives avec les concentrations plus faibles d'AIA (0 - 2.46 μ M). D'autre part, avec 0.44 μ M de BAP les plantules formées en présence de 0.49 μ M d'AIA avaient des racines plus ramifiées qu'à 7.38 μ M. De plus, pour des concentrations d'AIA allant de 0 μ M à 2.46 μ M et toujours en présence de 0.44 μ M de BAP, les plantules avaient des racines plus ramifiées que celles régénérées en présence d'une forte concentration de BAP, (4.44 μ M) puisque ce repère est resté constant et inférieur à un indice de 1 indépendamment de la concentration d'AIA.

L'indice d'opacité du milieu était nettement inférieur en absence de BAP (fig.3.3), ceci pour trois des quatre concentrations d'AIA qui ont été utilisées (0 μ M, 0.49 μ M et 7.38 μ M). Cet indice est resté constant en présence de BAP (0.44 – 4.44 μ M) pour toutes les concentrations d'AIA utilisées (0 – 7.38 μ M).

Les plantules viables formées en présence de 7.38 μ M d'AIA avaient un ratio nombre de racines (≥ 1 cm) /nombre de feuilles (≥ 1 cm) plus élevé qu'avec 0.49 μ M d'AIA, en absence de BAP (fig.3.4). Ce même ratio était aussi supérieur à celui de tous les autres traitements impliquant la BAP (0.44 μ M et 4.44 μ M), indépendamment de la concentration

d'AIA; ceci s'applique également au milieu renfermant 0 μM de BAP et 2.46 μM d'AIA, sauf pour la combinaison 0.44 μM de BAP et 2.46 μM d'AIA.

3.4 DISCUSSION

3.4.1 Effets des hormones de croissance sur le développement racinaire

In vivo, la première application pratique de l'auxine a mis à profit son influence bénéfique sur l'initiation de racines adventives chez les boutures. *In vitro*, dans des cals issus de moelle de tabac par exemple, les concentrations relatives en auxine et kinétine déterminent la formation soit de racines, soit de bourgeons. Des racines se forment en présence de plus fortes concentrations en auxine, et des bourgeons avec de plus fortes concentrations de cytokinine. Si l'auxine et la cytokinine sont à peu près à la même concentration, le cal continue de produire des cellules indifférenciées (Murashige et Skoog 1962). Husen et Pal (2007) ont démontré qu'une application exogène d'auxine joue un rôle important lors de l'initiation, l'émergence et le développement des primordia racinaires chez *Tectona grandis* (Husen et Pal, 2007). Elle peut favoriser l'augmentation de métabolites endogènes nécessaires à l'élongation et la division cellulaire lors de l'organogénèse de racines, à partir de bourgeons axillaires *in vitro* d'une orchidée, *Dendrobium nobile* cv. Emma white (Asghar *et al.*, 2011) et *in vivo*, chez des boutures de *Tectona grandis* (Husen et Pal, 2007). Chez la laitue, Koevary *et al.* (1978) ont dû transférer des plantules issues de bourgeons apicaux sur des milieux contenant 0.1 mg/l d'AIB pour l'induction de racines. Avec les concentrations d'AIA (0 à 7.38 μ M) utilisées dans notre étude, le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine ≥ 1 cm n'a pas été affecté. Le ratio nombre de racines ≥ 1 cm /nombre de feuilles ≥ 1 cm et le repère de ramification racinaire ont été les seules variables liées au développement racinaire des plantules viables pour lesquelles l'auxine ait eu un effet significatif : une concentration élevée d'AIA a favorisé une ramification racinaire plus importante en absence de BAP qu'en présence d'une faible concentration de BAP (0.44 μ M), et le ratio racines/feuilles a été plus élevé à 2.46 et 7.38 μ M d'AIA en absence de BAP. Les expériences de Peres *et al.* (2001) ont démontré, chez une orchidée (*Catasetum fimbriatum*) dont 60 % du poids sec est situé dans le système racinaire, que la concentration d'auxine est 20 fois plus élevée dans les tissus de cet organe de soutien et d'absorption comparativement aux autres organes où la cytokinine domine.

La concentration en BAP du milieu de culture a grandement affecté les variables liées à l'organogénèse racinaire de la laitue. En effet, le pourcentage d'explantats ayant

régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine ≥ 1 , le repère de ramification racinaire ainsi que le ratio nombre de racines ≥ 1 /nombre de feuilles ≥ 1 par plantule viable, ont présenté une baisse de leurs valeurs respectives en présence de BAP, et cette diminution s'est accentuée avec l'augmentation de la concentration de BAP dans le milieu. Le développement normal de la racine ne doit pas nécessiter l'application de cytokinine exogène.

3.4.2 Effets des hormones de croissance sur le développement aérien

L'implication de l'auxine (AIA) et de l'acide gibbérellique dans la formation de feuilles chez la tomate ou de fleurs chez *Arabidopsis* a été documentée (Reinhardt *et al.*, 2000). Par ailleurs la cytokinine est nécessaire pour le maintien du méristème, alors que le mouvement dynamique de l'auxine autour de celui-ci est indispensable pour l'initiation des feuilles au niveau du bourgeon de la tige. C'est l'une des façons dont ces deux hormones peuvent influencer le fonctionnement et l'organisation du bourgeon (Müller et Leyser, 2011). La BAP et la kinétine ont été couramment utilisées pour induire la formation de bourgeons lors de la régénération indirecte de la laitue (Kadkade et Seibert, 1977; Webb *et al.*, 1984; Brown *et al.*, 1986). Nos résultats montrent que la BAP ($p > 0.05$) affecte un peu la régénération lorsqu'il s'agit du développement aérien des plantules issues de bourgeons apicaux. En effet, le nombre de feuilles a augmenté légèrement en présence de $0.44 \mu\text{M}$ de BAP. Dans la même étude citée plus haut, Peres *et al.* (2001) ont montré que la concentration de cytokinine est 10 fois plus élevée dans les tissus de la stèle de la tige, comparativement aux autres organes, par exemple les racines dans lesquelles l'auxine domine.

3.4.3 Effets des hormones de croissance sur certaines des autres variables mesurées

Les hormones de croissance peuvent influencer presque tous les aspects de la croissance et du développement de la plante, tout dépendant de l'espèce et de leur concentration. Dans cette étude sur la laitue, ni l'AIA et ni la BAP n'ont eu d'effet significatif sur la formation des boutons floraux, possiblement en raison du moment précoce de la prise de données soit 6 semaines après la mise en culture.

De plus, lors de la préparation des explants pour la mise en culture, des blessures ont été causées, engendrant probablement l'exsudation d'enzymes de dégradation, de radicaux libres et de composés phénoliques à l'intérieur et autour des tissus. Ceci a

éventuellement entraîné des réactions d'oxydation par la polyphénol oxydase, favorisant le brunissement des tissus comme cela s'est produit au niveau des cals lors de la régénération indirecte de *Pinus virginiana* Mill (Tang et Newton, 2004). Dans cette étude le fait que l'indice d'opacité du milieu de culture soit positivement corrélé au pourcentage de cal de type brun ($r = 0.51^{***}$) et négativement au pourcentage de cal de type vert ($r = -0.66^{****}$) à la base des tiges des plantules viables appuie cette idée.

3.4.4 Effets du ratio auxine/cytokinine

Une étude sur la régénération indirecte de *Gerbera jamesonii* a mis en évidence que des explantats massifs peuvent être plus faciles à régénérer que des petits (Nhut *et al.*, 2007). Chez l'avocat (Zulficar *et al.*, 2009), les bourgeons apicaux renferment déjà une concentration endogène d'auxine, et il est possible que ce soit de même chez la laitue. Sachant que le ratio auxine/cytokinine favorable à la régénération est propre à chaque espèce, les concentrations d'AIA et de BAP utilisées dans le milieu de culture peuvent être favorables ou non à l'organogénèse. Delassando et Roberts (1971, cité dans Dodds et Roberts 1982) affirment que chez des explantats constitués de parenchyme de la moelle de laitue, différents patrons de différenciation en trachéides ont été observés dépendamment du type et de la concentration de cytokinine et d'auxine utilisés dans le milieu de culture. Dans cette étude, les effets significatifs des concentrations de BAP utilisées démontrent que les concentrations plus élevées ne favorisent pas la régénération racinaire et, de ce fait, des plantules. En effet, le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables, ayant au moins une feuille et une racine (≥ 1 cm), diminue progressivement avec l'augmentation de sa concentration, tout comme le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine.

La meilleure réactivité observée en l'absence de BAP dans le milieu indique possiblement que les concentrations hormonales endogènes de cette cytokinine dans le bourgeon apical étaient déjà optimales. Par ailleurs, le ratio nombre total de racines/nombre total de feuilles produites par plantule viable se situe bien en-dessous de 1 en présence de BAP et ce pour toutes les concentrations d'AIA. En absence de BAP le ratio est plus élevé, se situant autour de 1 en présence des deux concentrations plus fortes d'AIA. Cette diminution de ratio en présence de BAP n'est pas attribuable à une augmentation de la quantité de

feuilles produites par les plantules, qui semble plafonner avec l'augmentation de BAP (11 à 4.44 μM , $p \leq 0.05$) à un effectif qui n'est pas significativement différent de celui obtenu en l'absence de BAP (9.6 à 0 μM , $p \leq 0.05$). Elle est plutôt due à une plus faible quantité de racines produites en présence de BAP, ceci étant mis en évidence par la chute du pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine parallèlement à l'augmentation de BAP dans le milieu. Il faut noter que cette dernière variable est très fortement et positivement liée au pourcentage de viabilité ($r = 1.0****$).

L'indice d'opacité du milieu de culture est plus élevé en présence de BAP, et 'io6' est fortement et négativement corrélé ($r = -0.65****$) au pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables. Il est possible qu'un excès de BAP engendre l'activation des enzymes de dégradation spécifiques à cette hormone, pour tenter de rétablir le ratio optimal auxine/cytokinine. Un processus de ce type a été rapporté dans un système de culture d'apex de banane (Zaffari *et al.*, 2000), alors qu'une diminution des niveaux endogènes d'AIA semblait associée à une stimulation de l'AIA-oxydase. Les expériences de Mezzeti *et al.* (1997), concernant l'effet de l'interaction entre les hormones de croissance sur la morphogénèse *in vitro* de *Rubus fruticosus* et *Rubus idaeus*, ont montré que le brunissement des tissus ainsi que la formation de cal ou de tiges dépendaient à la fois du type et de la concentration des hormones utilisées et du génotype.

3.5 CONCLUSION

Cette expérience a permis de montrer que les explantats de laitue issus de bourgeons apicaux étaient beaucoup plus sensibles à la BAP qu'à l'AIA, aux concentrations utilisées. En effet la BAP a eu un effet négatif à la fois sur le pourcentage de plantules ayant produit au moins une racine (≥ 1 cm), le repère de ramification racinaire et la régénération des explantats en plantules viables. L'intensité de cette inhibition augmentait avec la concentration de BAP, et le milieu le plus favorable à la régénération directe des explantats apicaux de laitue en plantules ne contenait pas de BAP. Par ailleurs, indépendamment de la concentration utilisée, l'AIA n'a eu aucun effet significatif sur les variables clé viab₆, nofe₆, et ra₆, mais en a eu sur la ramification racinaire et le ratio nombre total de racines (≥ 1 cm) / nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable qui augmentaient en absence de BAP. Ceci indiquerait d'une part que les concentrations endogènes en auxine du bourgeon apical étaient quasi optimales et d'autre part, que celles utilisées dans le cadre de ce projet n'étaient pas assez élevées pour influencer le développement des plantules.

Pour donner suite à cette étude il serait intéressant de comparer la régénération de bourgeons apicaux et axillaires en faisant varier uniquement l'AIA à de plus fortes concentrations.

TABLEAU 3.1 Matrice de corrélation de Pearson (n-1)

Variables ^{yz}	lgb	larb	mort6	nofe6	tfe6	lgra6	plgra6	nora6	ram6	cal6
lgb	1									
larb	0.64****	1								
mort6	-0.16	-0.08	1							
nofe6	0.22	-0.05	-0.11	1						
tfe6	0.28	0.15	-0.05	0.70****	1					
lgra6	0.06	0.00	-0.19	-0.01	0.07	1				
plgra6	0.22	0.21	-0.29*	0.10	0.23	0.86****	1			
nora6	0.00	-0.04	-0.21	0.09	0.08	0.90****	0.75****	1		
ram6	0.30*	0.35*	-0.24	-0.18	-0.04	0.77****	0.78****	0.63****	1	
cal6	0.08	-0.16	-0.07	0.75****	0.56****	0.12	0.21	0.26	-0.20	1
calb6	-0.20	-0.40**	0.03	0.67****	0.47**	0.06	0.03	0.20	-0.33*	0.81****
calv6	0.31*	0.46**	0.21	-0.04	0.09	0.09	0.24	-0.01	0.40**	-0.24
io6	-0.35*	-0.41**	0.06	0.22	0.09	-0.40**	-0.49***	-0.24	-0.73****	0.22
iopl6	-0.17	-0.35*	-0.09	0.53****	0.35*	-0.15	-0.11	-0.01	-0.46**	0.66****
bfl6	-0.13	-0.14	-0.05	0.28	0.40**	-0.18	-0.09	-0.12	-0.32**	0.31*
con6	-0.00	0.07	0.46**	-0.42**	-0.31*	-0.16	-0.23	-0.18	-0.12	-0.26
fe6	0.20	0.10	-0.95****	0.07	0.02	0.18	0.26	0.20	0.28	0.01
ra6	0.36*	0.36*	-0.33*	0.05	0.15	0.68****	0.79****	0.58****	0.88****	-0.04
viab6	0.36*	0.36*	-0.33*	0.05	0.15	0.68****	0.79****	0.58****	0.88****	-0.04
ratioRF6	-0.07	0.00	-0.15	-0.15	-0.06	0.87****	0.76****	0.92****	0.71****	0.14

Variables ^{yz}	calb6	calv6	io6	iopl6	bflo6	con6	fe6	ra6	viab6	ratioRF6
lgb										
larb										
mort6										
nofe6										
tfe6										
lgra6										
plgra6										
nora6										
ram6										
cal6										
calb6	1									
calv6	-0.51***	1								
io6	0.51***	-0.66****	1							
iopl6	0.76****	-0.58****	0.68****	1						
bflo6	0.30*	-0.16	0.23	0.32*	1					
con6	-0.21	0.01	0.13	-0.18	-0.02	1				
fe6	-0.07	-0.21	-0.05	0.08	-0.16	-0.43**	1			
ra6	-0.21	0.39**	-0.65****	-0.28	-0.13	-0.31*	0.33*	1		
viab6	-0.21	0.39**	-0.65****	-0.28	-0.13	-0.31*	0.33*	1.00****	1	
ratioRF6	0.05	0.10	-0.40**	-0.14	-0.17	-0.05	0.16	0.61****	0.61****	1

^{y*}, **, ***, **** significatif à $p < 0.05, 0.01, 0.001$ et 0.0001 respectivement.

^zlgb = Longueur du bourgeon (en mm) avant prélèvement (du point d'insertion sur la tige du cœur de laitue jusqu'à son sommet); larb = Largeur (en mm) du bourgeon avant prélèvement (à sa base); mort6 = Pourcentage de mortalité à la 6^e semaine; nofe6 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; tfe6 = Longueur (mm) de la plus longue feuille de la plantule à la 6^e semaine; lgra6 = Somme des longueurs (en mm) de toutes les racines de la plantule à la 6^e semaine; plgra6 = Longueur (en mm) atteinte par la plus longue racine des plantules à la 6^e semaine; nora6 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; ram6 = Repère de ramification racinaire (0 = aucune ramification et 3 = très ramifié) à la 6^e semaine; cal6 = Diamètre maximal (en mm) du cal, à la base de la tige, à la 6^e semaine; calb6 = Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 6^e semaine; calv6 = Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 6^e semaine; io6 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); iopl6 = Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); bflo6 = Nombre de boutons floraux produits par les plantules à la 6^e semaine; con6 = Pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 6^e semaine; viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 6^e semaine; fe6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ra6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ratioRF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine.

TABLEAU 3.2 Anova à deux facteurs, BAP et AIA

Variables ^z	nofe6	ra6	ram6	io6	viab6	RatioRF6
<i>Cytokinine (BAP)</i>						
0 µM	9.6 ^b	92.0 ^a	2.5	0.5	92.0 ^a	0.8
0.44 µM	14.4 ^a	47.3 ^b	0.8	1.6	47.3 ^b	0.4
4.44 µM	11 ^{ab}	22.3 ^c	0	1.8	22.3 ^c	0.2
<i>Auxine (AIA)</i>						
0 µM	12.0	58.3	1.0	1.4	58.3	0.5
0.49 µM	12.4	60.7	1.2	1.2	60.7	0.4
2.46 µM	11.6	46.4	1.0	1.3	46.4	0.5
7.38 µM	10.6	50.0	1.1	1.3	50.0	0.6
<i>Effets significatifs^y</i>						
BAP	*	****	****	****	****	****
AIA	NS ^x	NS	NS	NS	NS	NS
BAP * AIA	NS	NS	**	*	NS	*

^z Pour ces variables, les analyses ont été appliquées sur les valeurs transformées par la fonction log.

^y nofe6 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; ra6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ram6 = Repère de ramification racinaire (0 = absence de ramification et 3 = très ramifié) à la 6^e semaine; io6 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ratioRF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine.

^x NS, *, **, ***, **** non significatif ou significatif à $p < 0.05$, 0.01, 0.001 et 0.0001 respectivement.

^wLes variables ayant des lettres différentes en exposant sont considérées comme significativement différentes selon Tuckey ($\alpha = 0.05$).

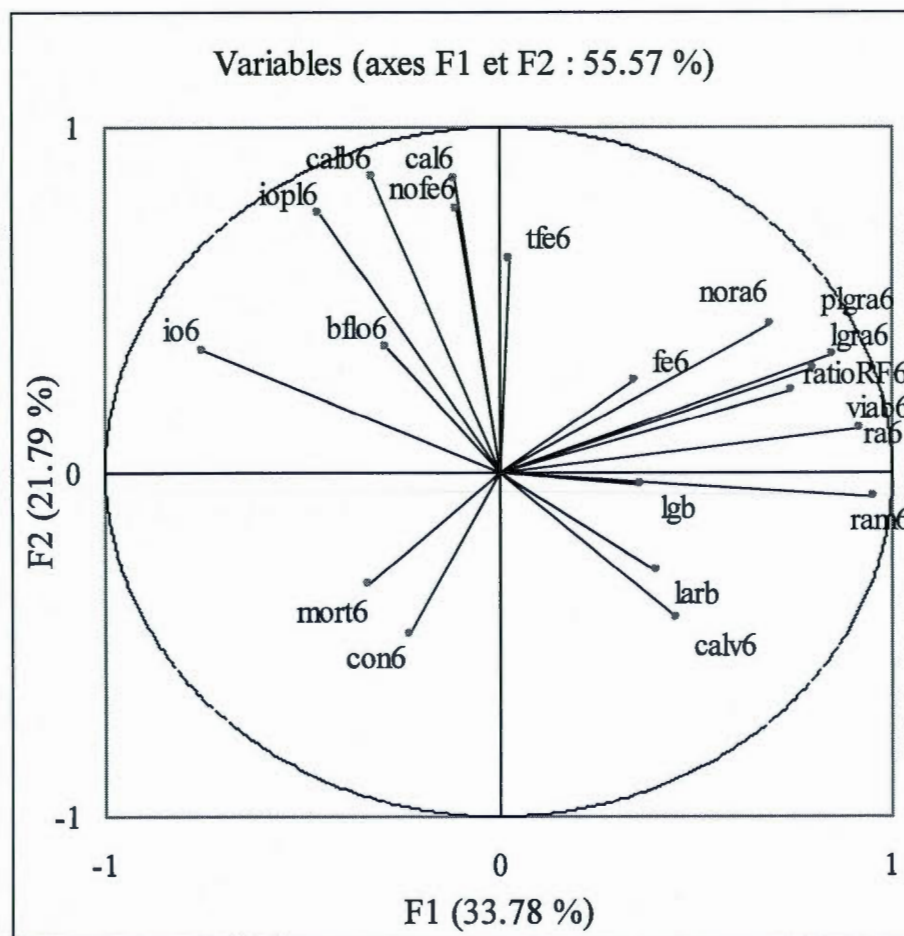


FIGURE 3.1 Analyse en composantes principales effectuée sur les variables mesurées à la 6^e semaine en culture, pour évaluer l'effet des combinaisons d'hormones :

nofe6 = nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules, tfe6 = longueur (en mm) de la plus longue feuille, nora6 = nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules, ram6 = ramification racinaire, lgra6 = Somme des longueurs (en mm) de toutes les racines de la plantule, plgra6 = longueur (en mm) atteinte par la plus longue racine de la plantule, cal6 = diamètre maximal (en mm) du cal à la base des tiges, calb6 = pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges, calv6 = pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges, io6 = indice d'opacité du milieu de culture (0 = milieu translucide à 5 = milieu très opaque), bfl6 = nombre de boutons floraux produits par les plantules, larb = largeur (en mm) du bourgeon avant prélèvement (à sa base), lgb = longueur du bourgeon (en mm) avant

prélèvement (du point d'insertion sur la tige du cœur de laitue jusqu'à son sommet), con6 = pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube, viab6 = pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine ≥ 1 cm et une feuille ≥ 1 cm), fe6 = pourcentage ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine, ra6 = pourcentage ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine, ratioRF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine.

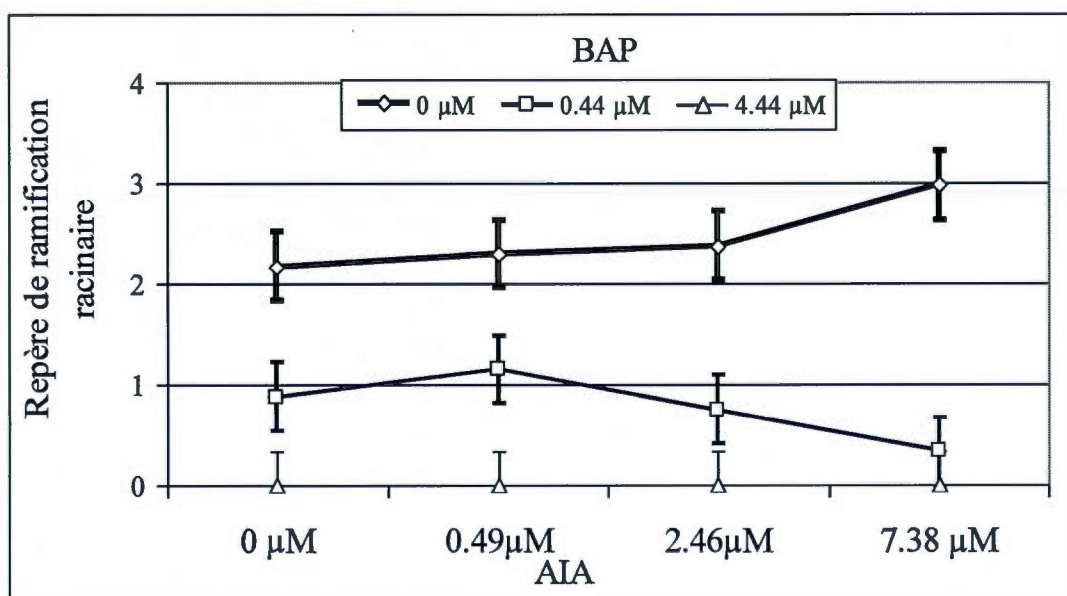


FIGURE 3.2 Repère de ramification racinaire des plantules, calculé pour chacune des concentrations de BAP en fonction des concentrations d'AIA utilisées, après 6 semaines de culture. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

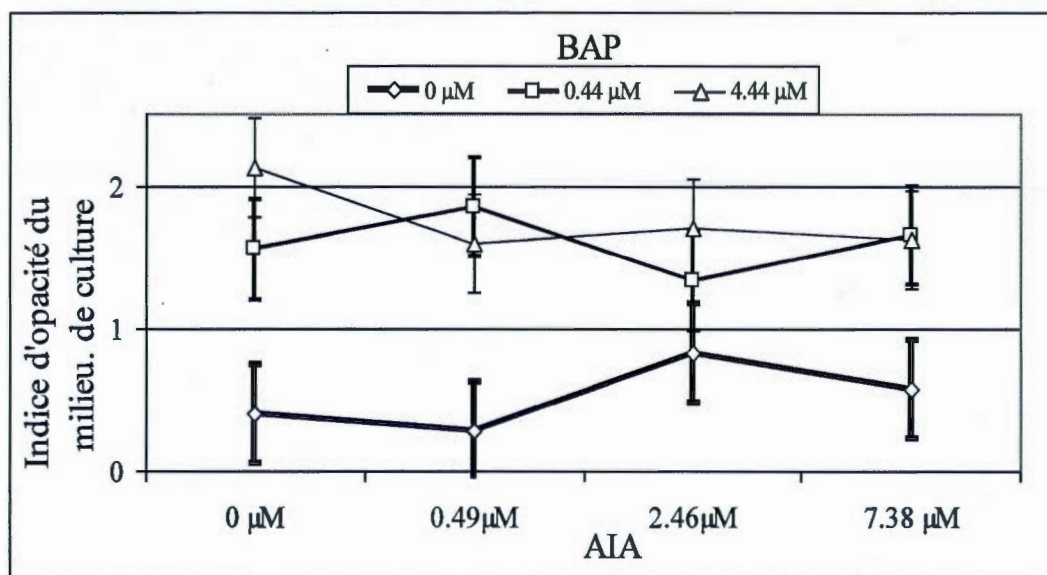


FIGURE 3.3 Indice d'opacité du milieu de culture, calculé pour chacune des concentrations de BAP en fonction des concentrations d'AIA utilisées, après 6 semaines de culture. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

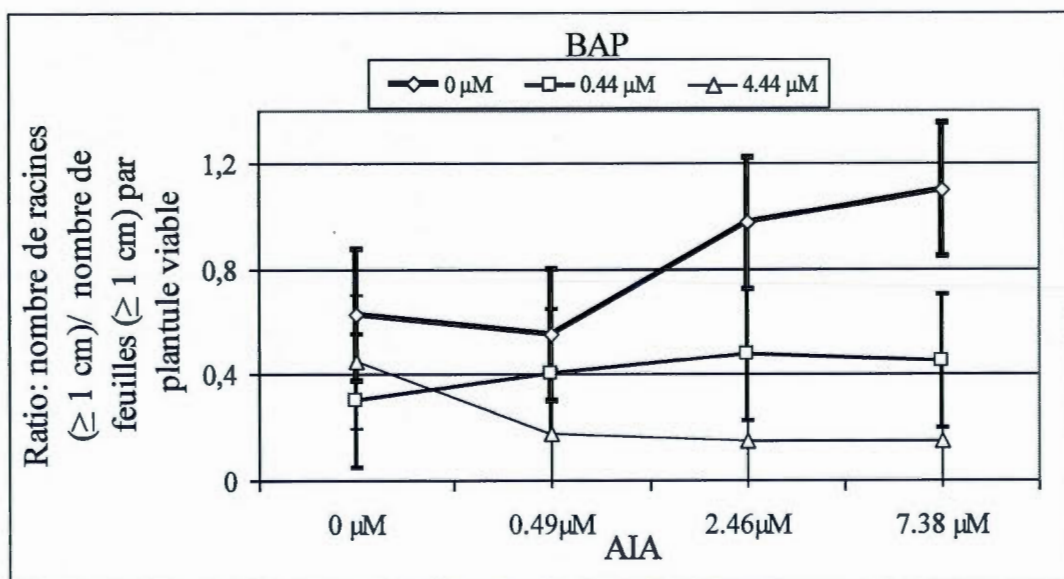


FIGURE 3.4 Ratio [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable], calculé pour chacune des concentrations de BAP en fonction des concentrations d'AIA utilisées, après 6 semaines de culture. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

3.6 BIBLIOGRAPHIE

- Addinsoft 2007. XLSTAT software. Release 2007. New York, NY, Addinsoft U.S.A.
- Asghar S., T. Ahmad, I.A. Hafiz et M. Yaseen. 2011. «*In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white». *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no 16, p. 3097-3103.
- Bloksberg L.N. et M.E.J. Salveit. 1986. «Regeneration of plants from axillary buds of harvested and stored heads of field-grown Iceberg lettuce». *Hortscience*, vol. 21, no 5, p. 1201-1203.
- Brown C., J.A. Lucas, I.R. Crute, G.A. Walkey et J.B. Power. 1986. «An assessment of genetic variability in somacloned lettuce plants (*Lactuca sativa*) and their offspring». *Annals of Applied Biology* vol. 109, p. 391- 407.
- Cline M.G. 1994. «The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development». *Physiologia Plantarum*, vol. 90, p. 230-237.
- Delassandro G. et L.W. Roberts. 1971. «Introduction of xylogenesis in pith parenchyma explants of *Lactuca*». *American Journal of Botany*, vol. 58, no 5, p. 378-385.
- Dodds J.H. et L.W. Roberts. 1982. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge: Cambridge University, 178 p.
- Husen A. et M. Pal. 2007. «Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. F. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment». *New Forest*, vol. 33, p. 309-323.
- Jenni S., F. Loukili et B.E. Moghaddam. 2006. «*In vitro* culture response of apical and axillary shoot-tips excised from crisphead lettuce cores depends on head maturity, not storage time». *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, vol. 42, no May-June, p. 274-277.
- Kadkade P.G. et M. Seibert. 1977. «Phytochrome-regulated organogenesis in lettuce tissue culture». *Nature*, vol. 270, no London, p. 49-50.
- Koevary K., L. Rappaport et L.L. Morris. 1978. «Tissue culture propagation of head lettuce». *Hortscience*, vol. 13, no 1, p. 39-41.
- Mezzetti B., G. Savini, F. Carnevali et D. Mott. 1997. «Plant genotype and growth regulators interaction affecting *in vitro* morphogenesis of blackberry and raspberry». *Biologia Plantarum*, vol. 39, no 1, p. 139-150.
- Müller D. et O. Leyser. 2011. «Auxin, cytokinin and the control of shoot branching». *Annals of Botany*, vol. 107, p. 1203-1212.

- Murashige T. et F. Skoog. 1962. «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures». *Plant Physiology*, vol. 15, p. 473-497.
- Nhut T.D., T.T.A. Trunong, T.D.H. Nguyen, T.D. Nguyen, Q.T. Nguyen et H.V. Nguyen. 2007. «Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverses thin cell layer culture». *Scientia Horticulturae*, vol. 111, p. 146- 151.
- Peres L.E.P., N. Majerowicz et G.B. Kerbaui. 2001. «Dry matter partitioning differences between shoots and roots in two contrasting genotypes of orchids and their relationship with endogenous levels of auxins, cytokinins and abscisic acid». *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, vol. 13, no 2, p. 185-195.
- Pink D.A.C. et P.J. Carter. 1987. «Propagation of lettuce (*Lactuca sativa*) breeding material by tissue culture». *Annals of Applied Biology* vol. 110, no 3, p. 611- 616.
- Reinhardt D., T. Mandel et C. Kuhlemeier. 2000. «Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs». *The Plant Cell*, vol. 12, p. 507-518.
- Salisbury F.B. et C.W. Ross. 1992. *Plant Physiology* 4th ed. Coll. «Wadsworth Biology». Belmont, California: Wadsworth Publishing Company, 682 p.
- SAS Institute Inc. 1999. *The SAS system for Windows*, Release 8.2. Cary, N.C.: SAS Institute
- Tang W. et R. Newton. 2004. «Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill)». *Elsevier*, vol. 167, p. 621-628.
- Webb D.T., L.D. Torres et P. Fobert. 1984. «Interaction of growth regulators, explant age, and culture environment controlling organogenesis from lettuce cotyledons *in vitro*». *Canadian Journal of Botany*, vol. 62, p. 586-590.
- Zaffari G.R., G.B. Kerbaui, J.E. Kraus et E.C. Romano. 2000. «Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation». *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 63, p. 187-192.
- Zulfiqar B., N.A. Abbasi, T. Ahmad et I.A. Hafiz. 2009. «Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte». *Pakistan Journal of Botany*, vol. 41, no 5, p. 2333-2346.

CHAPITRE IV

EFFICACITÉ ASEPTISANTE DE L'HYPOCHLORITE DE SODIUM ET DU PEROXYDE D'HYDROGÈNE ET VIABILITÉ DE PLANTULES DE LAITUE (*LACTUCA SATIVA* L.) RÉGÉNÉRÉES *IN VITRO* À PARTIR DE BOURGEONS

RÉSUMÉ

La régénération des explantats en plantules viables et exemptes de contaminants est l'un des premiers défis de la culture *in vitro*. Une expérience exploratoire avec des traitements portant sur l'efficacité aseptisante de différentes durées (10 et 15 minutes) d'application et de concentrations de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2 à 1.5 et 3 %) et d'hypochlorite de sodium (NaOCl à 0.6-0.9-1.2-1.8 %) a été effectuée afin d'établir les conditions favorisant la régénération directe de bourgeons axillaires de laitue en plantules. Les traitements utilisant des concentrations élevées de NaOCl seul ont donné les meilleurs résultats au niveau de la contribution (respectivement 24.87 %) pour l'axe d'un biplot corrélé aux variables de régénération. La seconde étape de cette étude a porté sur l'efficacité du NaOCl seul à 0.6, 1.2 et 1.8 % pendant 5, 10 et 15 minutes, pour l'aseptisation de bourgeons apicaux et axillaires. Les explantats issus des bourgeons axillaires étaient plus contaminés (31.9 pour les bourgeons axillaires vs 7.5 % pour les bourgeons apicaux, $p < 0.0001$) et avaient un pourcentage de régénération en plantules nettement inférieur à celui des explantats issus de bourgeons apicaux (47.2 pour les bourgeons apicaux vs 7.5 % pour les bourgeons axillaires, $p < 0.0001$). D'autre part, l'augmentation de la concentration de NaOCl ou la durée de l'aseptisation ont eu un effet sur le développement racinaire, foliaire et sur le taux de contamination dans le milieu de culture. En effet le pourcentage d'explantats, issus de bourgeons apicaux, ayant régénéré une plantule, pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) diminue avec l'augmentation de la concentration (53% à 0.6% de NaOCl et 27% à 1.8%, $p < 0.001$). Le pourcentage d'explantats, issus de bourgeons apicaux, ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) diminue avec l'augmentation de la concentration d'une part (92.5% à 0.6 % de NaOCl et 40% à 1.8 % de NaOCl pendant 10 minutes; 92.5% à 0.6 % de NaOCl et 40% à 1.8 % de NaOCl pendant 15 minutes, $p < 0.05$), mais aussi avec l'allongement de la durée d'aseptisation (72.5% à 5 minutes contre 40% à 10

minutes et 30% à 15 minutes pour une concentration de 1.8% de NaOCl, $p<0.05$). Le pourcentage de contamination diminue avec l'augmentation de la durée (26.7% à 5 minutes et 14.2% à 15 minutes, $p<0.05$).

Le maintien d'un équilibre entre les pourcentages de contamination et de régénération des explantats en plantules viables nécessite de rester conservateur quant au choix du traitement d'aseptisation adéquat, qui semble être l'application de NaOCl à 1.2 % pendant 10 minutes.

MOTS CLÉS

Lactuca sativa L., *in vitro*, culture de bourgeons, aseptisation, hypochlorite de sodium, peroxyde d'hydrogène

4.1 INTRODUCTION

Les milieux nutritifs utilisés en culture *in vitro* sont assez riches pour favoriser le développement d'une multitude de contaminants. La présence de moisissures, de levures ou de colonies bactériennes sur le milieu de culture, est un phénomène très courant (Kyte, 1987). Les quatre principales sources d'infection sont : l'explantat (contaminants internes et externes), le milieu de culture (stérilisation inefficace), l'air ou les instruments et finalement, le technicien de laboratoire (techniques de travail non standardisées). Or, les trois derniers foyers d'infestation peuvent être efficacement contrôlés avec les outils et techniques modernes. Il existe plusieurs méthodes pour stériliser les instruments de travail, les liquides et le matériel végétal. Elles sont catégorisées de la façon suivante : stérilisation sèche, humide, chimique, ultrafiltration et rayons ultraviolets. Seule la stérilisation chimique est utilisée pour le matériel végétal (Dodds et Roberts, 1982).

En sus de la contamination, l'état physiologique de la plante-mère et la toxicité des désinfectants sont d'autres facteurs pouvant causer la perte de matériel végétal (Kyte, 1987). L'aseptisation de surface du matériel végétal se fait à l'aide d'une solution aqueuse. Or, certains tissus peuvent contenir des microorganismes endogènes, d'où la nécessité de prélever des tissus sains (Dodds et Roberts, 1982). D'autre part, la possibilité que les tissus de surface de l'explantat soient endommagés lors de l'aseptisation est omniprésente. Pour cette raison le choix du décontaminant, de sa durée d'utilisation ainsi que de sa concentration se font en tenant compte du type et du niveau de souillure des explantats. En effet, ils peuvent être très souillés, présenter des interstices difficilement accessibles, être couverts de couches protectrices (cutine et subérine), ou avoir des appendices sur leur épiderme (Dodds et Roberts, 1982). Ces types d'explantats ne subiront pas le même traitement que des explantats lisses, propres ou possédant un tissu spongieux comme c'est le cas dans cette étude. Les tissus superficiels, qui auront à subir l'aseptisation, peuvent être préservés (stérilisation douce) ou non (stérilisation plus vigoureuse) (Pierik, 1987).

L'éthanol est l'un des désinfectants couramment utilisés en culture *in vitro*. Toutefois, bien qu'il ait déjà servi (à une concentration de 40 %) comme prétraitement de stérilisation sur des explantats de laitue (Alçonero, 1988), il n'a pas été retenu pour ce projet. En effet, une étude préliminaire a indiqué que les tissus parenchymateux sous-jacents aux

bourgeons ont bruni au premier contact. Parmi les autres agents chimiques couramment utilisés pour la laitue, le chlorure de mercure (HgCl_2), utilisé par Doerschug et Miller (1967) pour stériliser des semences, est très efficace mais aussi très dangereux car c'est un poison (Dodds et Roberts, 1982). Pink et Carter (1987) ont utilisé une solution de dichloroisocyanure de sodium ($\text{C}_3\text{N}_3\text{O}_3\text{Cl}_2\text{Na}$) pour la stérilisation de bourgeons axillaires. Ce produit, vendu sous forme de poudre, n'a pas été considéré, car il est dangereux : il peut accélérer la combustion, devient explosif en présence d'hypochlorite de calcium et d'humidité, et cause l'irritation des yeux et de la peau. La majorité des études font usage d'eau de javel à des concentrations aussi faibles que 0.1 % (Koevary *et al.*, 1978) ou plus couramment, à 1 % (Pink, 1992). De ce fait, l'hypochlorite de sodium (NaOCl) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ont été sélectionnés dans le cadre de cette étude, à la fois pour leur accessibilité et leur facilité d'utilisation. Leur emploi est sécuritaire, bien que l'inhalation du NaOCl puisse causer une irritation des bronches ou un œdème pulmonaire, et que le contact avec la peau puisse causer une irritation (Dodds et Roberts, 1982).

La mise au point de l'aseptisation d'explantats issus de bourgeons apicaux et axillaires de laitue (*Lactuca sativa* L.) a été faite en deux étapes. Une première expérience a été effectuée en couplant ou non l'utilisation de H_2O_2 et de NaOCl et par la suite, seul le NaOCl a été utilisé. Dans les deux cas, des concentrations et des temps d'exposition différents ont été testés dans le but d'identifier les conditions favorisant le meilleur pourcentage de régénération de plantules viables, à partir de bourgeons apicaux et axillaires.

4.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

4.2.1 Première expérience

4.2.1.1 Matériel végétal

Des cœurs du cultivar Raider, une laitue de type pommé provenant de la compagnie Vegpro (Sherrington, Québec), ont été récoltés au mois de septembre 2009. Ils ont été entreposés à 2 °C pendant 21 jours, avant l'extraction des explantats pour la mise en culture. Pendant la dernière fin de semaine d'entreposage, il y eut un bris dans le système de refroidissement de la chambre froide, ce qui a entraîné un dégât d'eau dans celle-ci. De ce fait, la glacière contenant les cœurs de laitue s'est remplie d'eau. Le matériel végétal a passé 72 heures immergé dans des conditions non stériles et à des températures nettement supérieures aux 4 °C recommandés.

4.2.1.2 Prélèvement, aseptisation et excision des explantats

Les bourgeons axillaires ainsi que les tissus sous-jacents ont été extraits à l'aide d'un emporte-pièce en cuivre de 1 cm de large et 2.5 cm de long. Un maximum de 2 bourgeons axillaires a été prélevé par cœur de laitue. Les explantats furent aseptisés sous hotte à flux laminaire, par immersion avec agitation dans une solution désinfectante à laquelle une goutte de Tween 80 (Fisher Scientific BP338-500) par 100 ml a été ajoutée. Ensuite ils ont subi trois rinçages successifs de 5 minutes chacun dans de l'eau nanopure stérile (autoclavée pendant 20 minutes à 103.3 kPa et 121 °C). Quatorze traitements d'aseptisation, présentant diverses combinaisons de NaOCl, H₂O₂ et durées d'immersion (tabl.4.1), ont été appliqués. Deux dilutions de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) en solution aqueuse 30 % (Anachemia, 46644-280) ont été préparées à 1.5 % et 3 %.

Avant la mise en culture, les explantats ont été taillés selon une coupe de type carré à 6 mm de long, afin d'enlever les couches de tissus endommagés au cours de l'étape d'aseptisation.

4.2.1.3 Milieu de culture

Les explantats ont été mis en culture dans un milieu de base Murashige et Skoog (1962) renfermant du saccharose (30 g/l), de l'agar (8 g/l, de type Bacto, Sigma M9274) et

4.92 μM d'AIB (Sigma 15386-25G). Une fois le pH ajusté à 5.7, le milieu nutritif fut versé dans des tubes de 25 x 150 mm (12 ml/tube) scellés avec des bouchons Kim Kap et le tout stérilisé à l'autoclave à 103.3 kPa et 121 °C, pendant 20 minutes. Les explantats ont été insérés dans le milieu jusqu'à la base du bourgeon, immergeant ainsi tout le parenchyme sous-jacent à celui-ci. Aucun des explantats n'a été repiqué ou acclimaté au cours de cette expérience. Ils ont été maintenus sur ce milieu pendant 6 semaines.

4.2.1.4 Conditions environnementales dans la chambre de culture *in vitro*

La température moyenne était de 12 °C la nuit et 16 °C le jour. La photopériode de 16 heures à 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ a été assurée par des néons de 48", 40 W (F40/ agro de Philips, Wesco, Saint-Jean-sur-Richelieu).

4.2.1.5 Dispositif expérimental

L'expérience a été conçue sous forme d'un dispositif aléatoire, où chaque individu représentait une répétition à raison de 12 individus par traitement. Le bilan des traitements est le suivant :

14 traitements d'aseptisation x 12 tubes par traitement (unité expérimentale) = 168 tubes ou explantats issus de bourgeons axillaires.

Quatre-vingt dix cœurs de laitue ont été utilisés pour le prélèvement des explantats.

4.2.1.6 Variables mesurées

Afin de comparer les différents traitements, un certain nombre de variables quantitatives et qualitatives ont été relevées à la 6^e semaine *in vitro* (les chiffres des codes se réfèrent à la semaine de culture pendant laquelle le relevé a été effectué). Les variables qualitatives ont été évaluées comme l'absence (0) ou la présence (1) du phénomène indiqué, ou son ampleur (de 0 à 5) (cf, liste des abréviations).

Les variables quantitatives comprenaient : nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites (nofe6), nombre de racines (≥ 1 cm) produites (nora6), longueur de la plus longue feuille (tfe6, en mm) et diamètre maximal du cal à la base des tiges (cal6, en mm), pourcentage de cal de type vert à la base des tiges (calv6), pourcentage de cal de type brun à la base des tiges (calb6), pourcentage de mortalité (mort6), pourcentage de contamination bactérienne ou fongique

dans le tube (con6), pourcentage de contamination fongique dans le tube (conf6), pourcentage de contamination bactérienne dans le tube (conb6), pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (viab6 : 0 = absence de feuille et/ou de racine ≥ 1 cm et 1 = présence d'au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), pourcentage de plantules viables montrant la présence d'exsudat à la base de leur tige (exupl6), pourcentage de production d'exsudat (exu6), pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) (fe6); pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) (ra6); [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] (ratioRF6).

Les variables qualitatives étaient l'indice d'opacité du milieu de culture (io6 : 0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) et l'indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) (iopl6).

Les pourcentages de mortalité, de contamination, de régénération en plantules viables, de production d'exsudat (exu6), d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) et d'au moins une racine (≥ 1 cm), ainsi que l'indice d'opacité du milieu de culture, ont été relevés sur l'ensemble des tubes et calculés par rapport au nombre initial d'explantats mis en culture. Les autres variables ont été relevées sur les plantules viables régénérées et leurs pourcentages établis par rapport à ces dernières.

4.2.1.7 Analyse statistique

Dans un premier temps, une analyse « biplot » a été faite en utilisant le logiciel de traitement de données XLSTAT (Addinsoft, 2007), afin d'identifier les variables corrélées entre elles (Analyse du coefficient de corrélation de Pearson) et de visualiser comment les traitements se positionnent par rapport au regroupement des variables corrélées. La représentation graphique (fig. 4.1) à la fois des variables et des traitements a été faite en suivant les deux axes principaux (F1 et F2) des variations.

Cette analyse « biplot » a aussi fourni le tableau de corrélation des variables (tabl. 4.2), permettant ainsi de chiffrer l'importance de la variation de chacune des variables en fonction de chacun des axes F1 et F2. Parallèlement, nous avons obtenu le tableau mesurant la contribution de chacun des traitements aux axes F1 et F2 (tabl. 4.3), permettant ainsi de mesurer l'affinité de chacun des traitements pour l'un ou l'autre de ces axes. L'analyse et la

comparaison de ces trois documents devraient permettre la mise en évidence des traitements qui sont étroitement liés aux variables d'intérêts pour cette étude.

4.2.2 Deuxième expérience

4.2.2.1 Matériel végétal

Des cœurs du cultivar Estival, une laitue de type pommé, ont été récoltés en juin 2010 sur la Ferme Hotte et Van Winden (Napierville, Québec), au stade de maturité commerciale. Les cœurs ont été prélevés et entreposés à 2 °C pendant 3, 4, 5 et 8 jours, ce qui correspond respectivement aux répétitions 1, 2, 3 et 4, avant l'extraction des explantats pour la mise en culture.

4.2.2.2 Prélèvement, aseptisation et excision des explantats

Les bourgeons apicaux et axillaires ainsi que les tissus sous-jacents ont été extraits à l'aide d'un emporte-pièce en cuivre de 1 cm de large et 2.5 cm de long. Ils ont été aseptisés sous hotte à flux laminaire, par immersion avec agitation dans une solution désinfectante à laquelle une goutte de Tween 80 (Fisher Scientific BP338-500) par 100 ml a été ajoutée. Ensuite, ils ont subi trois rinçages successifs de 5 minutes chacun dans de l'eau nanopure stérile (autoclavée pendant 20 minutes à 103.3 kPa et 121 °C). Neuf traitements présentant diverses combinaisons de NaOCl et durées d'immersion (tabl. 4.5) ont été appliqués.

Avant la mise en culture, les explantats avaient été taillés selon une coupe de type diamant de 6 mm de long afin d'enlever les couches de tissus endommagés au cours de l'étape d'aseptisation.

4.2.2.3 Milieu de culture et conditions environnementales dans la chambre de culture *in vitro*.

Les paramètres sont les mêmes que ceux décrits aux par. 4.2.1.3 et 4.2.1.4.

4.2.2.4 Dispositif expérimental

L'expérience a été conçue sous forme de plan factoriel complet. Ce dernier comprend 2 facteurs et 4 blocs répétitifs, à raison d'un bloc par jour. Chacun des blocs compte 180 individus représentant chacun un essai. Les individus ont été répartis de façon aléatoire dans les blocs. Le bilan des traitements est le suivant :

9 traitements d'aseptisation x 2 types d'explantats x 10 tubes par traitement (unité expérimentale) = 180 tubes par répétition x 4 = 720 tubes ou explantats.

Au total, 360 cœurs de laitue ont été utilisés pour le prélèvement des explantats.

4.2.2.5 Variables mesurées

Afin de comparer les différents traitements, un certain nombre de variables quantitatives et qualitatives ont été relevées à la 6^e semaine *in vitro* (les chiffres des codes réfèrent à la semaine de culture pendant laquelle le relevé a été effectué). Les variables qualitatives ont été évaluées comme l'absence (0) ou la présence (1) du phénomène indiqué, ou son ampleur (de 0 à 5) (cf, liste des abréviations).

Les variables quantitatives comprenaient : nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites (nofe6), nombre de racines (≥ 1 cm) produites (nora6), longueur de la plus longue feuille (tfe6), somme des longueurs de toutes les racines (≥ 1 cm) produites (lgra6, en mm), longueur de la plus longue racine (plgra6, en mm), diamètre maximal du cal à la base des tiges (cal6, en mm), pourcentage de mortalité (mort6), pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges (calb6), pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges (calv6), pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube (con6), pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (viab6 : 0 = absence de feuille et/ou de racine ≥ 1 cm et 1 = présence d'au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) (fe6); pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) (ra6); [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] (ratioRF6).

Les variables qualitatives comprenaient : indice d'opacité du milieu de culture (io6 : 0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque et repère de ramification racinaire (ram6 : 0 = absence de ramification et 3 = système racinaire très ramifié) et indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) (iopl6).

Les pourcentages de mortalité, de contamination, de régénération en plantules viables, d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) et d'au moins une racine (≥ 1 cm), ainsi que l'indice d'opacité du milieu de culture, ont été relevés sur l'ensemble des tubes et calculés par rapport au nombre initial d'explantats mis en

culture. Les autres variables ont été relevées sur les plantules viables régénérées et leurs pourcentages établis par rapport à ces dernières.

4.2.2.6 Analyse statistique

Dans un premier temps, une analyse en composantes principales (ACP) a été faite en utilisant le logiciel de traitement de données XLSTAT (Addinsoft, 2007), afin d'identifier les variables corrélées entre elles (Analyse du coefficient de corrélation de Pearson) et de sélectionner, parmi les variables mesurées pour l'aseptisation des tissus, un sous-ensemble de variables pour les analyses subséquentes.

Par la suite une analyse de variance a été effectuée, en utilisant la procédure GLM (SAS Institute Inc, 1999), permettant ainsi la mise en évidence des différences significatives entre les traitements de décontamination.

Le modèle linéaire a été ajusté, pour chacune des répétitions, en faisant la moyenne des variables numériques et le pourcentage des variables binaires. Au besoin, certaines données ont été transformées par la fonction racine carrée et logarithmique, pour satisfaire à l'homogénéité de variances, ainsi qu'à l'homoscédasticité et la normalité de distribution des résidus. Ces valeurs ont été représentées graphiquement à l'aide de barres représentant 95 % de l'intervalle de confiance.

4.3 RÉSULTATS

4.3.1 Première expérience

Le biplot (fig.4.1) a servi à identifier la redondance dans le jeu de données à l'aide des deux composantes principales (F1 et F2) qui expliquent 72.69 % de la variabilité des paramètres à l'étude, et à localiser les traitements ayant le plus d'affinités avec ces axes (F1 et F2). Des corrélations significatives ont été mises en évidence et identifiées sur le biplot par les angles aigus entre les vecteurs des variables. Plus l'angle est petit, plus les variables sont corrélées. D'un autre côté plus un traitement est placé près d'un axe, plus il contribue à la variation de celui-ci. Une variable fortement corrélée à un axe pourrait être considérée comme liée à un traitement qui y contribue généreusement. La relation entre les deux sera proportionnelle à l'affinité de chacun d'entre eux pour l'axe en question.

Ainsi les variables (tabl. 4.2) nombre de feuilles produites 'nofe6' (0.96), longueur de la plus longue feuille 'tfe6' (0.93), nombre de racines produites 'nora6' (0.97), pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges 'calb6' (0.77), indice d'opacité du milieu de culture (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) 'io6' (0.78), pourcentage de production d'exsudat à la 6^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat) 'exu6' (0.85), pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) 'fe6' (0.94), le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) 'ra6' (0.91), ainsi que le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables 'viab6' (0.98), étaient fortement et positivement corrélés à l'axe F1. À l'égard des variables mesurant les plantules en difficulté, à savoir l'indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) 'iop16' (0.71), le pourcentage de mortalité 'mort6' (0.67), le pourcentage de plantules viables montrant la présence d'exsudat à la base des tiges (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat) 'exup16' (0.71), le pourcentage de contamination bactérienne dans le tube 'conb6' (0.88) et le pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube 'con6' (0.87), elles étaient fortement et positivement corrélées à l'axe F2.

Pour ce qui est de l'apport des traitements (tabl. 4.1) à chacun des axes (tabl. 4.3), le traitement T10C1.8 (24.87 %) est celui qui a le plus fortement contribué à l'axe F1 et pour l'axe F2 il s'agissait des traitements T15C1.2 (13.26 %) et C1.8P3 (55.77 %). Tous les autres

traitements ont participé à l'un ou l'autre axe ou aux deux mais à de plus faibles pourcentages.

4.3.2 Deuxième expérience

Les deux composantes principales (F1 et F2) de l'ACP expliquent 76.19% de la variabilité ($p < 0.001$) des paramètres à l'étude (fig. 4.2). Des corrélations significatives ont été mises en évidence, à l'égard des variables mesurées sur l'état de santé des plantules (tabl.4.5). Le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables 'viab6' était fortement et positivement corrélé au repère de ramification racinaire 'ram6' ($r = 0.45^{****}$), au diamètre maximal du cal à la base des tiges 'cal6' ($r = 0.62^{****}$), au pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges 'clab6' ($r = 0.61^{****}$), au pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges 'calv6' ($r = 0.86^{****}$) et dans une plus faible mesure à l'indice d'opacité du milieu de culture 'io6' ($r = 0.35^{**}$) et à l'indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables 'iopl6' ($r = 0.39^{**}$). Les variables mort6, viab6 et con6 étant importantes pour cette expérience, elles ont été conservées pour les autres analyses.

Pour ce qui est des variables mesurées sur les feuilles (tabl. 4.5), le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) 'fe6' était fortement et positivement corrélé au nombre de feuilles produites par les plantules 'nofe6' ($r = 0.82^{****}$), à la longueur de la plus longue feuille de la plantule 'tfe6' (0.61^{****}).

Parmi les variables mesurées sur les racines, le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) 'ra6' étaient positivement corrélé à la somme des longueurs de toutes les racines produites par les plantules 'lgra6' ($r = 0.41^{***}$), au nombre de racines produites par les plantules 'nora6' ($r = 0.31^{**}$) et à la longueur de la plus longue racine produite par les plantules 'plgra6' (0.40^{****}). Les variables 'fe6' et 'ra6' ont été préservées pour identifier les traitements favorisant une plus forte organogénèse foliaire et racinaire chez les explantats régénérés en plantules de laitue.

Les regroupements ci-dessus ont permis d'identifier la variable la plus représentative parmi celles qui sont corrélées entre elles, ce qui a grandement facilité les analyses statistiques et l'interprétation des données. Lors de la sélection les variables quantitatives ont d'abord été priorisées. Ensuite, les paramètres faisant référence à des organes différents ont été sélectionnés pour enrichir l'analyse globale de l'expérience (ra6, fe6). Certaines variables

ont été préservées bien qu'elles étaient corrélées à une autre, parce qu'elles étaient importantes pour cette expérience (viab6, mort6, con6). D'autres ont simplement été mises de côté pour éviter la redondance de l'information ou parce qu'elles apportaient peu d'informations à ce projet (nofe6, tfe6, nora6, lgra6, plgra6, calb6, calv6, io6, iopl6). Le ratio nombre total de racines/nombre total de feuilles produites par plantule viable, bien qu'il ne fût corrélé à aucune des variables retenues, a tout de même été mis de côté car le modèle n'était pas représentatif après analyse. Après ce tri, cinq variables ont été retenues pour les analyses de variances, il s'agit de mort6, fe6, ra6, con6, viab6.

Le pourcentage de contamination (tabl.4.6) était affecté par le type de bourgeon qui forme l'explantat et la durée d'aseptisation, mais non par la concentration. Les plantules formées à partir de bourgeons axillaires avaient un pourcentage de contamination plus de quatre fois plus élevé ($p < 0.0001$) que celles obtenues à partir de bourgeons apicaux. De plus, les traitements de 5 minutes d'aseptisation avaient un pourcentage de contamination près de deux fois plus élevé que ceux de 15 minutes ($p < 0.05$), indépendamment de la concentration d'hypochlorite de sodium.

Les interactions entre le type de bourgeon ayant fourni l'explantat et la durée d'exposition à l'hypochlorite d'une part, et entre le type de bourgeon et la concentration d'autre part, étaient significatives pour le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (tabl.4.6). Le pourcentage de bourgeons apicaux régénérés en plantules viables était similaire pour toutes les durées d'aseptisation (fig.4.3A). Pour cette même variable (fig.4.3B), 0.6 % de NaOCl a donné un meilleur pourcentage de régénération à partir des bourgeons apicaux qu'une concentration de 1.8 %. De plus, ce pourcentage a toujours été supérieur à celui obtenu à partir de bourgeons axillaires, et cela à tous les temps d'exposition ($p < 0.05$) et à toutes les concentrations ($p < 0.001$). En outre, pour les axillaires, le pourcentage est resté stable indépendamment de la concentration.

Le pourcentage de plantules mortes en fin d'expérience a diminué en fonction de la durée d'aseptisation ($p < 0.01$, fig.4.4A) et de la concentration de NaOCl ($p < 0.05$, fig.4.4B), pour les plantules formées à partir de bourgeons apicaux seulement. En effet, il y a eu moins de pertes avec la durée de 15 minutes comparativement à celle de 5 minutes, et ce, avec des concentrations respectives de NaOCl de 1.8 % versus 0.6 %.

En ce qui concerne le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm), (fig.4.5), chez les plantules provenant de bourgeons apicaux, sans être significativement différent du traitement à 1.2% de NaOCl pendant 10 minutes, ce pourcentage était plus faible chez les traitements d'aseptisation faits à 1.8% de NaOCl pendant 10 et 15 minutes que toutes les autres combinaisons de temps et de concentration. D'autre part, l'aseptisation faite avec 1.8% de NaOCl pendant 15 minutes a généré plus de plantules ayant au moins une feuille que celle faite à 0.6 et 1.2% pendant 5 minutes, ainsi que 1.2% pendant 15 minutes. En dehors des traitements à 1.8% pendant 10 et 15 minutes, le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) était toujours plus élevé chez les apicaux.

Le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) (fig.4.6) était similaire chez celles issues des bourgeons apicaux aux trois durées d'aseptisation. Chez celles issues des axillaires, ce pourcentage était plus élevé à 15 minutes de décontamination qu'à 5 minutes. Toujours en fonction de la durée de 5 minutes, il y avait un pourcentage plus élevé de plantules avec racines régénérées à partir des bourgeons apicaux qu'à partir des bourgeons axillaires. En fonction de la concentration de NaOCl utilisé, ce pourcentage était resté stable chez les plantules issues des explantats axillaires, quoiqu'il était inférieur à celui des plantules régénérées à partir d'explantats apicaux à 0.6 et 1.2% de NaOCl. De plus il y avait plus d'explantats ayant régénéré une plantule ayant formé au moins une racine (≥ 1 cm) à 0.6% de NaOCl qu'à 1.8% lors de la régénération des explantats apicaux.

4.4 DISCUSSION

Le succès d'un protocole de culture *in vitro* commence par une aseptisation efficace des explantats. Dans cette étude, le NaOCl a été utilisé seul ou en combinaison avec du H₂O₂, à différentes concentrations. Le NaOCl est couramment utilisé dans la décontamination des tissus en raison de ses propriétés oxydatives pouvant tuer les microorganismes de façon non spécifique. En plus d'être peu dispendieux, il est facile à trouver (Asghar *et al.*, 2011). De plus, il ne nécessite pas de manipulation ni de méthode de disposition particulières, ce qui le rend moins dangereux pour l'environnement et pour les techniciens de laboratoires que d'autres produits (Maina *et al.*, 2010).

4.4.1 Première expérience

Cette expérience d'exploration, faite dans des conditions de contamination extrêmes (paragraphe 4.2.1.1), a permis d'identifier le type de traitement répondant aux exigences de l'étude. Les bourgeons axillaires ont été utilisés parce qu'un niveau de contamination significativement plus élevé a été retrouvé chez ce type d'explantats lors d'études préliminaires, comparativement à ceux formés à partir de bourgeons apicaux. D'autre part, le prélèvement des tissus a été fait sur des cœurs de laitue qui ont été récoltés dans les champs. Certaines études ont démontré que ce type d'explantats présente plus de contaminations comparativement à ceux prélevés sur des plants provenant de serres (Pink et Carter, 1987). Par ailleurs les cœurs ont été entreposés pendant une longue durée (21 jours), ce qui a eu pour effet d'augmenter le niveau d'oxydation des tissus. Enfin, en raison d'un bris dans la chambre à environnement contrôlé, le matériel végétal a passé 72 heures immergé dans des conditions non stériles à des températures supérieures à 4 °C.

En résumé, une grande variabilité a été observée dans les résultats et aucun traitement n'a émergé comme favorisant à la fois un faible pourcentage de contamination et une forte régénération des explantats en plantules. Par contre nous avons noté que les traitements à faible concentration de NaOCl (0.6 %, 0.9 %, 1.2 %) étaient associés à une faible régénération des explantats (axe F1) ou à une plus grande mortalité de ceux-là (F2). À l'opposé, le traitement de forte concentration de NaOCl (1.8%), utilisé seul, est associé à une

meilleure organogénèse des explantats en plantules viables (F1). De ce fait, l'ajout de H_2O_2 ne semble pas justifié.

4.4.2 Deuxième expérience

L'hypochlorite de sodium (NaOCl) a longtemps été utilisé pour l'aseptisation de l'eau, des légumes, des fruits, et des tissus en culture *in vitro* (Cerioni *et al.*, 2009). Il peut être utilisé seul ou en combinaison avec d'autres produits. L'aseptisation de cotylédons d'*Arachis hypogaea* a été plus efficace avec le chlorure de mercure qu'avec l'hypochlorite de sodium, mais dans les deux cas la régénération a été similaire (Maina *et al.*, 2010). Tout comme dans le premier chapitre, cette étude a démontré que la capacité de régénération dépend du type de bourgeon utilisé comme explantat. En effet, le pourcentage de régénération des explantats en plantules viables était plus élevé pour ceux issus de bourgeons apicaux ($p < 0.0001$). Chez les explantats et plantules issus de bourgeons axillaires, le pourcentage de contamination plus élevé (31.9%-7.5%, $p < 0.0001$), combiné à un pourcentage de mortalité plus élevé (40 et 25% à 5 et 10 minutes d'exposition, $p < 0.01$; 42 et 32.5% à 0.6 et 1.2% de NaOCl, $p < 0.05$) ont pu causer cette différence au niveau du pourcentage de régénération des plantules. Toutefois, la durée d'exposition et la concentration de la solution aseptique exercent aussi un effet. Chez *Linum usitatissimum*, Yildiz et Er (2002) ont mis en évidence que l'augmentation de la concentration du NaOCl (de 2, 3 et 4 %) d'une part et de sa température (de 10, 20 et 30 °C) de l'autre, affectent négativement la germination des semences ainsi que la capacité de régénération des hypocotyles prélevés.

Les protocoles d'aseptisation de surface visent à utiliser la plus faible concentration pouvant désinfecter le tissu (Yildiz et Er, 2002), sachant que la capacité de régénération des explantats est négativement affectée par les plus fortes concentrations ainsi que les plus longues durées d'exposition (Pierik, 1987; Stafford et Warren, 1991). Chez les bourgeons apicaux de laitue, la concentration de NaOCl est le paramètre qui induit des différences significatives dans le pourcentage d'organogénèse des explantats. La plus forte concentration (1.8 %) a produit le pourcentage de régénération le moins élevé ($p < 0.001$), alors que la durée n'a pas eu d'effet significatif sur la régénération des plantules d'un même type de bourgeons.

Une expérience sur la décontamination de cotylédons d'*Arachis hypogaea* (Maina *et al.*, 2010) a révélé que le génotype n'influçait pas le pourcentage de régénération des

explantats en plantules viables, mais nos résultats (chapitre 2) indiquent qu'il est envisageable que la vitesse de régénération diffère entre les géotypes de laitue. L'étude de Bloksberg et Salveit (1986) sur la régénération à partir de bourgeons axillaires de laitue Iceberg a démontré que le meilleur protocole de décontamination consistait à agiter les explantats pendant 20 minutes dans une solution de NaOCl 1 % (représentant quatre fois leur volume), contenant 2 gouttes de Tween 80 par 100 ml. Ces auteurs ont transféré les plantules sur un milieu d'enracinement 7 à 15 jours après la mise en culture, ce qui a favorisé grandement la régénération du bourgeon en plantule; ils ont poursuivi leur expérience jusqu'à l'acclimatation. Ils ont ainsi obtenu des plantules régénérées et saines pour environ 50 % des explantats issus de bourgeons axillaires. Or, dans notre étude seulement 7.5 % des explantats axillaires ont été considérés comme générateurs de plantules viables, ayant au moins une feuille et une racine d'au moins 1 cm de long après 6 semaines *in vitro* ($p < 0.0001$). Cette grande différence pourrait être due au fait que les plantules ont été maintenues sur le même milieu et que l'expérience a pris fin bien avant la période d'acclimatation. Par ailleurs dans les travaux de Bloksberg et Salveit (1986), seuls les tissus méristématiques des bourgeons axillaires ont été préservés et la grande majorité des autres types de tissus ont été excisés, en raison de la présence de contaminants dans ces derniers, alors que dans notre cas une certaine quantité de tissus parenchymateux sous-jacents aux bourgeons a été conservée lors de la mise en culture. De plus, les expériences de Bloksberg et Salveit (1986) se différencient de la nôtre par le fait que nous en sommes encore à l'étape d'optimisation de l'aseptisation, alors qu'ils ont déjà franchi cette étape au cours d'une étude préliminaire. Cette dernière a fait ressortir le traitement de 20 minutes dans 1 % de NaOCl comme étant le plus performant.

4.5 CONCLUSION

Les résultats de la partie exploratoire de ce travail montrent que l'utilisation de NaOCl seul ou en combinaison avec du H_2O_2 donnent des résultats équivalents. Toutefois, l'utilisation de plusieurs produits nécessite plus de manipulation, laissant ainsi plus de place à l'erreur humaine ce qui peut augmenter les risques de contamination.

La seconde étape de cette étude a permis de démontrer que le bourgeon apical a une meilleure capacité de régénération que le bourgeon axillaire, cela indépendamment de la concentration de NaOCl utilisée ou de sa durée d'application. Elle a aussi mis en évidence que l'augmentation de la durée d'aseptisation et de la concentration de NaOCl influence négativement certaines des variables retenues, telles que le développement racinaire et foliaire ainsi que la présence de contaminants dans le milieu de culture. Le traitement effectué avec 1.2 % de NaOCl pendant 10 minutes se rapproche le plus de l'équilibre à établir entre la réduction des contaminants et l'augmentation du pourcentage de régénération des explantats en plantules viables. De plus cette concentration et cette durée favorisent tout de même l'organogénèse racinaire, qui est souvent le facteur imprévisible lors de la culture *in vitro* de bourgeons de laitue (Koevary *et al.*, 1978).

Pour donner suite à cette étude, il faudrait limiter le choix des concentrations de NaOCl autour de 1.2 %, pour une durée d'aseptisation variant de 10 à 20 minutes, en prenant soin d'ajouter non pas une, mais deux gouttes de Tween par 100 ml de solution d'aseptisation dans la mesure où une partie des tissus sous-jacents aux bourgeons, pouvant contenir des contaminants, sont conservés lors de la mise en culture.

TABLEAU 4.1 Combinaison des traitements de la première expérience

Traitements ^z	Durée (en minutes)	NaOCl (en %)	H ₂ O ₂ (en %) ^z
T10C0.6	10	0.6	-
T15C0.6	15	0.6	-
T10C0.9	10	0.9	-
T15C0.9	15	0.9	-
T10C1.2	10	1.2	-
T15C1.2	15	1.2	-
T10C1.5	10	1.5	-
T15C1.5	15	1.5	-
T10C1.8	10	1.8	-
T15C1.8	15	1.8	-
C1.5P1.5	10	1.5	1.5
C1.5P3	10	1.5	3
C1.8P1.5	10	1.8	1.5
C1.8P3	10	1.8	3

^zT10C0.6 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 10 minutes; T15C0.6 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 15 minutes; T10C0.9 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.9 % pendant 10 minutes; T15C0.9 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.9 % pendant 15 minutes; T10C1.2 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 10 minutes; T15C1.2 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 15 minutes; T10C1.5 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 minutes; T15C1.5 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 15 minutes; T10C1.8 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes; T15C1.8 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à

1.8 % pendant 15 minutes; C1.5P1.5 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 1.5%; C1.5P3 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %; C1.8P1.5 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 1.5 %; C1.8P3 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %.

TABLEAU 4.2 Tableau de corrélation des variables avec les axes F1 et F2 du biplot.

Variables ^y	F1 ^z	F2
mort6	-0.41	0.67
nofe6	0.96	0.08
tfe6	0.00	0.00
nora6	0.97	0.05
calb6	0.77	0.36
calv6	0.00	0.00
io6	-0.78	-0.17
iopl6	0.31	0.71
exu6	-0.85	-0.11
exupl6	0.07	0.71
comp6	-0.37	0.19
conb6	-0.28	0.88
fe6	0.94	0.11
ra6	0.91	-0.13
viab6	0.98	0.16
con6	-0.34	0.87
RatioRF6	0.76	-0.19

^z F1 et F2 sont les axes principaux représentant 72.69 % de la variation des variables.

^y mort6 = Pourcentage de mortalité à la 6^e semaine; nofe6 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; tfe6 = Longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule à la 6^e semaine; nora6 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; calb6 = Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 6^e semaine; calv6 = Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 6^e semaine; io6 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); iopl6 = Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); exu6 = Pourcentage de production d'exsudat à la 6^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat); exupl6 = Pourcentage de plantules viables montrant la présence d'exsudat à la base des tiges à la 6^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat); fe6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ra6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm)

à la 6^e semaine; conf6 = Pourcentage de contamination fongique dans le tube à la 6^e semaine; conb6 = Pourcentage de contamination bactérienne dans le tube à la 6^e semaine; viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), à la 6^e semaine; con6 = Pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 6^e semaine; ratioRF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine.

TABLEAU 4.3 Tableau présentant la contribution (%) de chacun des traitements aux axes F1 et F2 du biplot

Traitements ^y	F1 ^z	F2
T10C0.6	6.22	1.33
T15C0.6	9.36	0.11
T10C0.9	2.75	3.14
T15C0.9	7.85	6.40
T10C1.2	6.62	2.51
T15C1.2	5.50	13.26
T10C1.5	0.57	5.12
T15C1.5	0.54	1.22
T10C1.8	24.87	3.70
T15C1.8	8.62	0.00
C1.5P1.5	2.41	0.92
C1.5P3	9.39	2.67
C1.8P1.5	8.51	3.85
C1.8P13	6.76	55.77

^z F1 et F2 sont les axes principaux représentant 72.69 % de la variation des variables.

^yT10C0.6 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 10 minutes; T15C0.6 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 15 minutes; T10C0.9 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.9 % pendant 10 minutes; T15C0.9 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.9 % pendant 15 minutes; T10C1.2 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 10 minutes; T15C1.2 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 15 minutes; T10C1.5 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 minutes; T15C1.5 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 15 minutes; T10C1.8 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes; T15C1.8 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à

1.8 % pendant 15 minutes; C1.5P1.5 = des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 1.5 %; C1.5P3 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %; C1.8P1.5 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 1.5 %; C1.8P3 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion, pendant 10 minutes, dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 3 %.

TABLEAU 4.4 Combinaisons des traitements de la deuxième expérience

Traitements ^z	NaOCl (%)	Durée (en minutes)
T5C0.6	0.6	5
T5C1.2	1.2	5
T5C1.8	1.8	5
T10C0.6	0.6	10
T10C1.2	1.2	10
T10C1.8	1.8	10
T15C0.6	0.6	15
T15C1.2	1.2	15
T15C1.8	1.8	15

^zT5C0.6 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 5 minutes; T5C1.2 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 5 minutes; T5C1.8 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 5 minutes; T10C0.6 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 10 minutes; T10C1.2 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 10 minutes; T10C1.8 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes; T15C0.6 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 15 minutes; T15C1.2 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 15 minutes; T15C1.8 = Aseptisation des bougeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 15 minutes.

TABLEAU 4.5 Matrice de corrélation de Pearson pour la deuxième expérience

Variables ^{yz}	mort6	nofe6	tfe6	lgra6	plgra6	nora6	ram6	cal6
mort6	1							
nofe6	-0.42***	1						
tfe6	-0.28*	0.84***	1					
lgra6	-0.16	0.54**	0.60***	1				
plgra6	-0.35**	0.49***	0.50***	0.66***	1			
nora6	-0.05	0.35**	0.44***	0.83***	0.45***	1		
ram6	-0.21	0.39**	0.33**	0.39**	0.75***	0.18	1	
cal6	-0.50***	0.59***	0.56***	0.64***	0.81***	0.49***	0.56***	1
calb6	-0.24*	0.69***	0.52***	0.42***	0.28*	0.35**	0.22	0.37**
calv6	-0.45***	0.52***	0.37**	0.28*	0.49***	0.14	0.42***	0.53***
io6	-0.18	0.40***	0.50***	0.15	0.08	0.10	0.04	0.18
iopl6	-0.15	0.48***	0.60***	0.50***	0.44***	0.55***	0.36**	0.50***
con6	0.66***	-0.40***	-0.27*	-0.22	-0.45***	-0.19	-0.35**	-0.59***
fe6	-0.59***	0.82***	0.61***	0.37**	0.49***	0.21	0.39**	0.62***
ra6	-0.51***	0.61***	0.49***	0.41***	0.40***	0.31**	0.29*	0.58***
viab6	-0.48***	0.77***	0.56***	0.44***	0.54***	0.30*	0.45***	0.62***
ratioRF6	0.08	-0.12	-0.04	0.41***	0.23	0.70***	-0.00	0.31*

Variables ^{yz}	calb6	calv6	io6	iopl6	con6	fe6	ra6	viab6	ratioRF6
mort6									
nofe6									
tfe6									
lgra6									
plgra6									
nora6									
ram6									
cal6									
calb6	1								
calv6	0.12	1							
io6	0.17	0.33**	1						
iopl6	0.31***	0.30*	0.43***	1					
con6	-0.27*	-0.47***	0.11	-0.24*	1				
fe6	0.56***	0.77***	0.36**	0.39**	-0.52***	1			
ra6	0.48***	0.74***	0.40***	0.37**	-0.46***	0.69***	1		
viab6	0.61***	0.86***	0.35**	0.39**	-0.52***	0.90***	0.84***	1	
ratioRF6	0.00	-0.05	-0.10	0.33**	-0.14	-0.13	0.01	-0.04	1

^z *, **, ***, **** significatif à $p < 0.05$, 0.01 , 0.001 et 0.0001 respectivement.

^y mort6 = Pourcentage de mortalité à la 6^e semaine; nofe6 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; tfe6 = Longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule à la 6^e semaine; lgra6 = Somme des longueurs (en mm) de toutes les racines de la plantule à la 6^e semaine; plgra6 = Longueur (en mm) atteinte par la plus longue racine de la plantule à la 6^e semaine; nora6 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; ram6 = Repère de ramification racinaire (0= aucune

ramification et 3= très ramifié) à la 6^e semaine; cal6= Diamètre maximal (en mm) du cal à la base des tiges à la 6^e semaines; calb6 = Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 6^e semaine; calv6 = Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 6^e semaine; io6 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5= milieu très opaque); iopl6 = Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); con6 = Pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 6^e semaine; fe6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ra6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), à la 6^e semaine; ratioRF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine.

TABLEAU 4.6 Anova des traitements d'aseptisation

Variables ^{xy}	mort6	con6 ^z	fe6	ra6	viab6
<i>Temps (minutes)</i>					
T5	28.8	26.7 ^a	42.1	35.0	27.9
T10	19.2	18.3 ^{ab}	41.3	37.5	25.0
T15	9.8	14.2 ^b	42.1	45.0	29.2
<i>NaOCl (%)</i>					
0.6	25.0	26.3	48.8	42.9	32.9
1.2	17.5	18.3	40.4	38.3	25.8
1.8	14.6	14.6	36.7	36.3	23.3
<i>Types de bourgeon</i>					
AP	6.7	7.5	70.8	48.9	47.2
AX	31.4	31.9	13.1	29.4	7.5
<i>Effets significatifs</i>					
Temps	****	*	NS	NS	NS
NaOCl	*	NS	*	NS	NS
bourgeon	****	****	****	****	****
tps*bourgeons	**	NS ^w	**	**	*
NaOCl * bourgeon	*	NS	****	**	***
Temps * NaOCl	NS ^z	NS	NS	NS	NS
Tps*NaOCl*bourgeon	NS	NS	*	NS	NS

^z Pour cette variable, les analyses ont été appliquées sur les valeurs transformées par la fonction racine carré.

^y mort6 = Pourcentage de mortalité à la 6^e semaine; con6 = Pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 6^e semaine; fe6= Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ra6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), à la 6^e semaine

^x NS, *, **, ***, **** Non significatif ou significatif à $p < 0.05$, 0.01, 0.001 et 0.0001 respectivement.

^w Les variables ayant des lettres différentes en exposant sont considérées comme significativement différentes selon Tuckey ($\alpha = 0.05$).

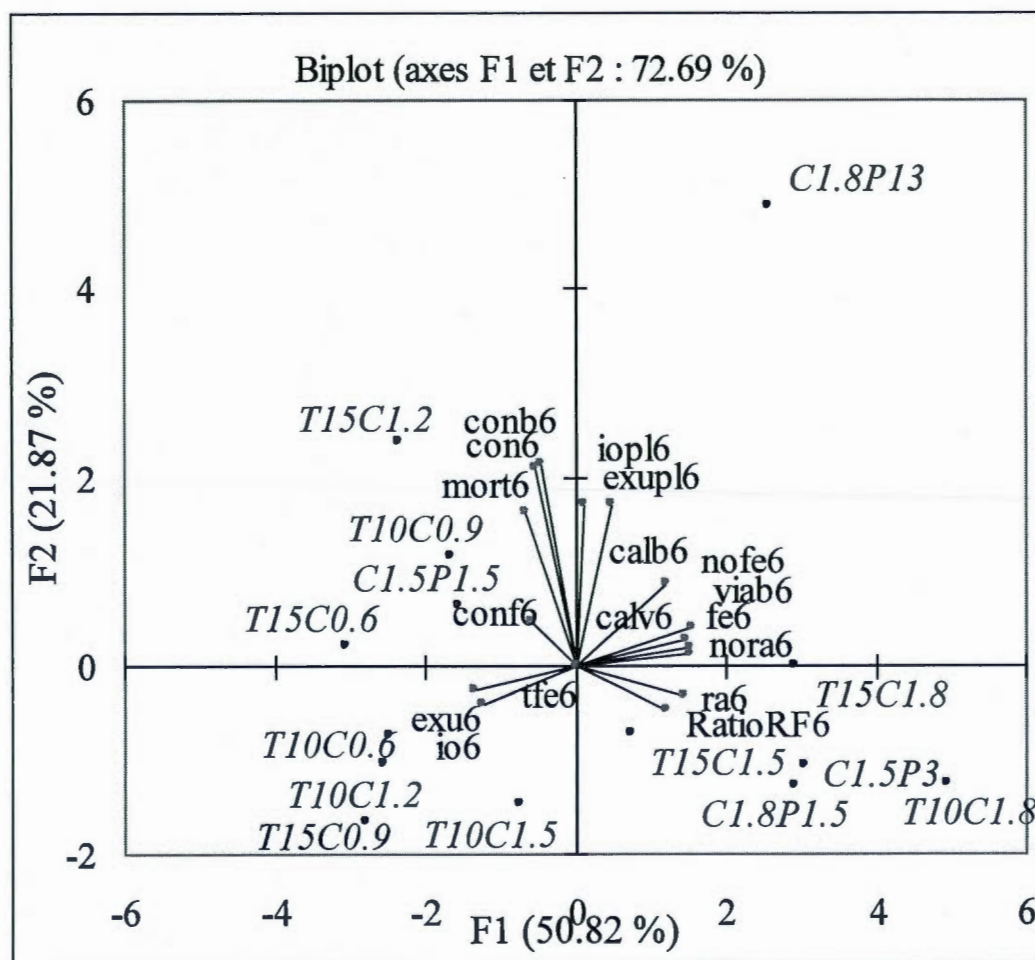


FIGURE 4.1 Représentation graphique du biplot illustrant la variation des variables sur les 2 axes principaux (F1 et F2) en fonction des traitements effectués pour l'aseptisation (1^{ère} expérience).

Le biplot illustre à la fois comment les variables varient sur les axes (F1 et F2) et la corrélation qui existe entre elles (plus l'angle est aigu, plus les variables sont corrélées), ainsi que la contribution de chacun des traitements aux axes F1 et F2 en fonction de leur position.

Les variables (relevées après 6 semaines) qui ont été représentées sont : *nofe6* = nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules, *nora6* = nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules, *tfe6* = longueur (en mm) de la plus longue feuille, *cal6* = le diamètre (en mm) maximal du cal à la base des tiges, *mort6* = pourcentage de mortalité, *calb6* = pourcentage de cal brun produit à la base des tiges, *calv6* = pourcentage de cal vert

produit à la base des tiges, io6 = indice d'opacité du milieu de culture (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque), iopl6 = indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque), con6 = pourcentage de contamination, conf6 = pourcentage de contamination fongique, conb6 = pourcentage de contamination bactérienne, fe6 = pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm). ra6 = pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm), viab6 = pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), à la 6^e semaine, ,exu6 = pourcentage de production d'exsudat à la base des tiges, ratioRF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable].

Les traitements représentés sont : Aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.6 % pendant 10 (T10C0.6) et 15 minutes (T15C0.6); aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 0.9 % pendant 10 (T10C0.9) et 15 minutes (T15C0.9); aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.2 % pendant 10 (T10C1.2) et 15 minutes (T15C1.2); aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 (T10C1.5) et 15 minutes (T15C1.5); aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 (T10C1.8) et 15 minutes (T15C1.8); aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.5 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion pendant 10 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 1.5 % (C1.5P1.5) et à 3 % (C1.5P3); aseptisation des bourgeons par immersion dans une solution d'hypochlorite de sodium à 1.8 % pendant 10 minutes, suivie d'une immersion pendant 10 minutes dans une solution de peroxyde d'hydrogène à 1.5 % (C1.8P1.5) et à 3 % (C1.8P3).

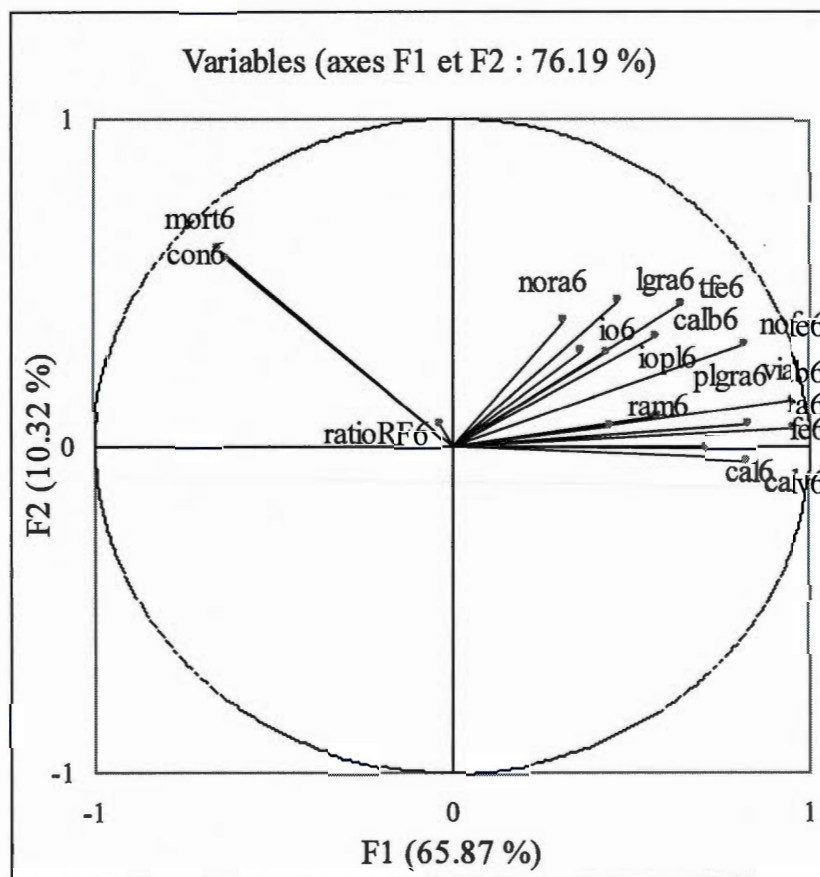


FIGURE 4.2 Analyse en composantes principales effectuée sur les variables mesurées après 6 semaines pour l'aseptisation (2^e expérience).

No6 = nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules, nora6 = nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules, tfe = longueur (en mm) de la plus longue feuille, lgra6 = Somme des longueurs (en mm) de toutes les racines de la plantule, plgra6 = Longueur (en mm) atteinte par la plus longue racine de la plantule, cal6 = diamètre maximal (en mm) du cal à la base des tiges, mort6 = pourcentage de mortalité, calb6 = pourcentage de cal brun produit à la base des tiges, calv6 = pourcentage de cal vert produit à la base des tiges, io6 = indice d'opacité du milieu de culture (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque), iopl6 = indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque), con6 = pourcentage de contamination, viab6 = pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), ram6 = repère de ramification racinaire, fe6 = pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule

pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ra6 = pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ratioRF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine.

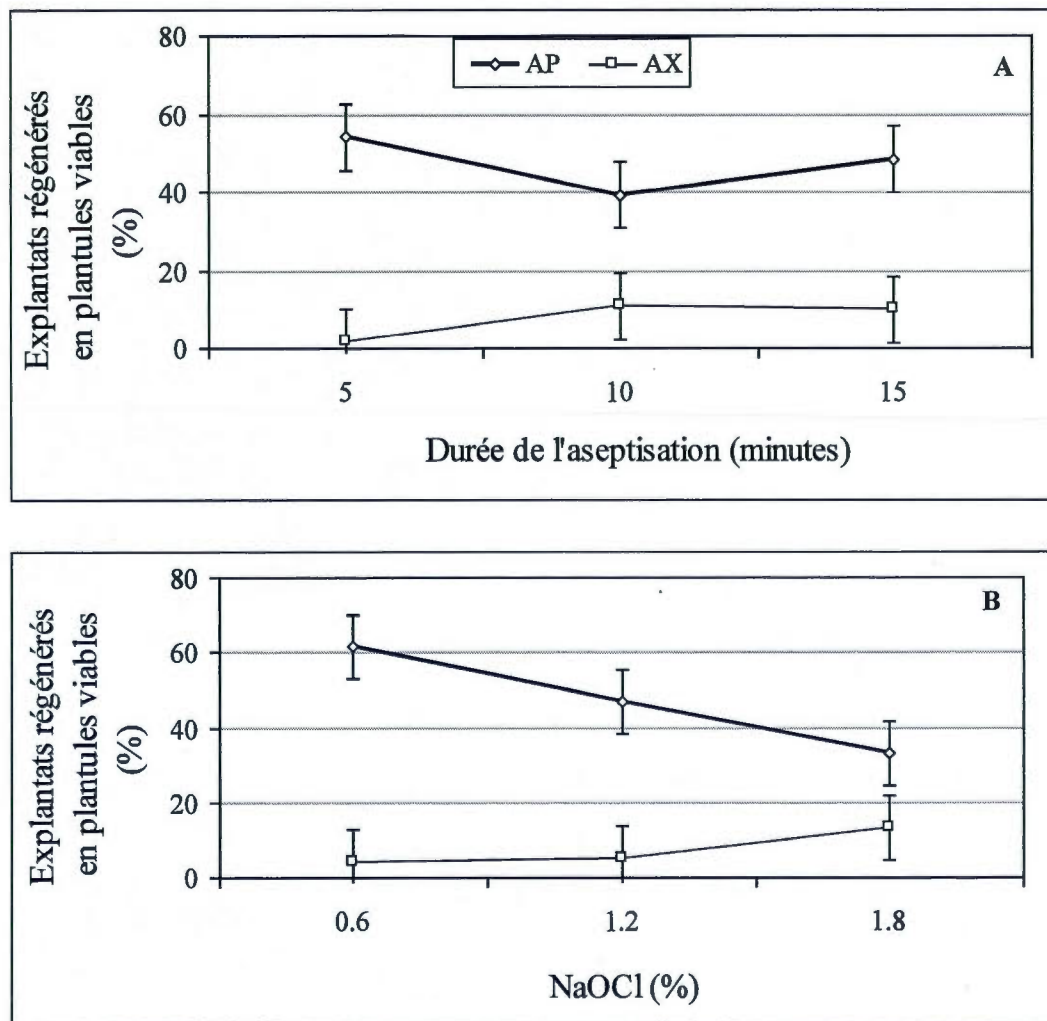


FIGURE 4.3 Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables, en fonction (A) du temps de stérilisation et (B) du pourcentage de NaOCl en solution. Ce sont des données arsin transformées. AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

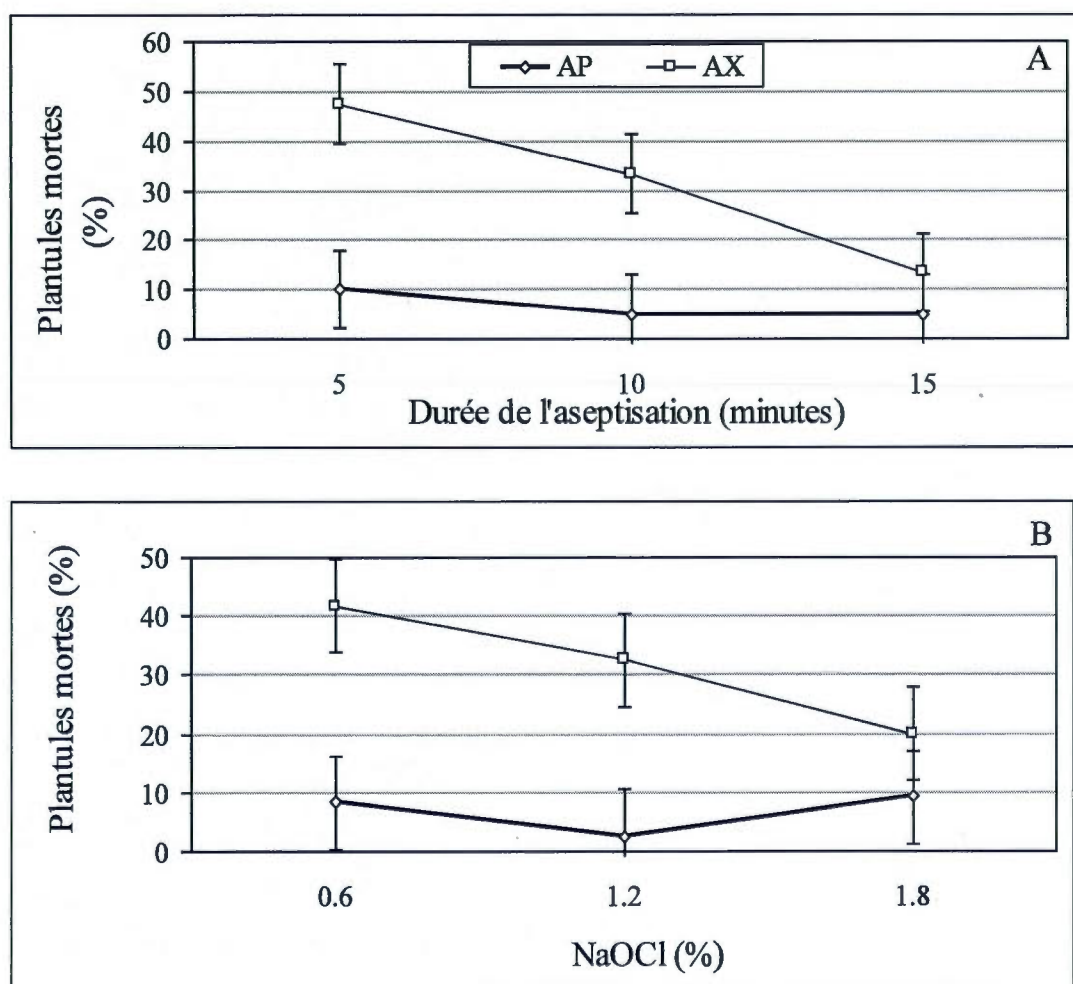


FIGURE 4.4 Pourcentage de plantules mortes en fin d'expérience, en fonction (A) du temps de stérilisation et (B) du pourcentage de NaOCl en solution. AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La mortalité a été relevée sur le nombre initial de plantules viables. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

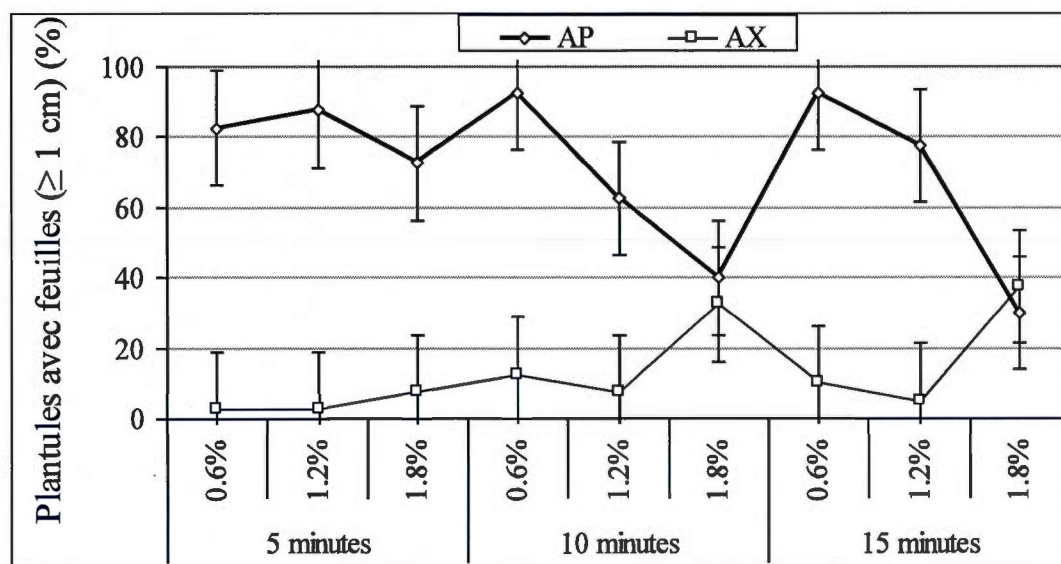


FIGURE 4.5 Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm), pour chaque type de bourgeon en fonction des durées d'aseptisation et des concentrations de NaOCl en solution (0.6 %, 1.2 % et 1.8 %). AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

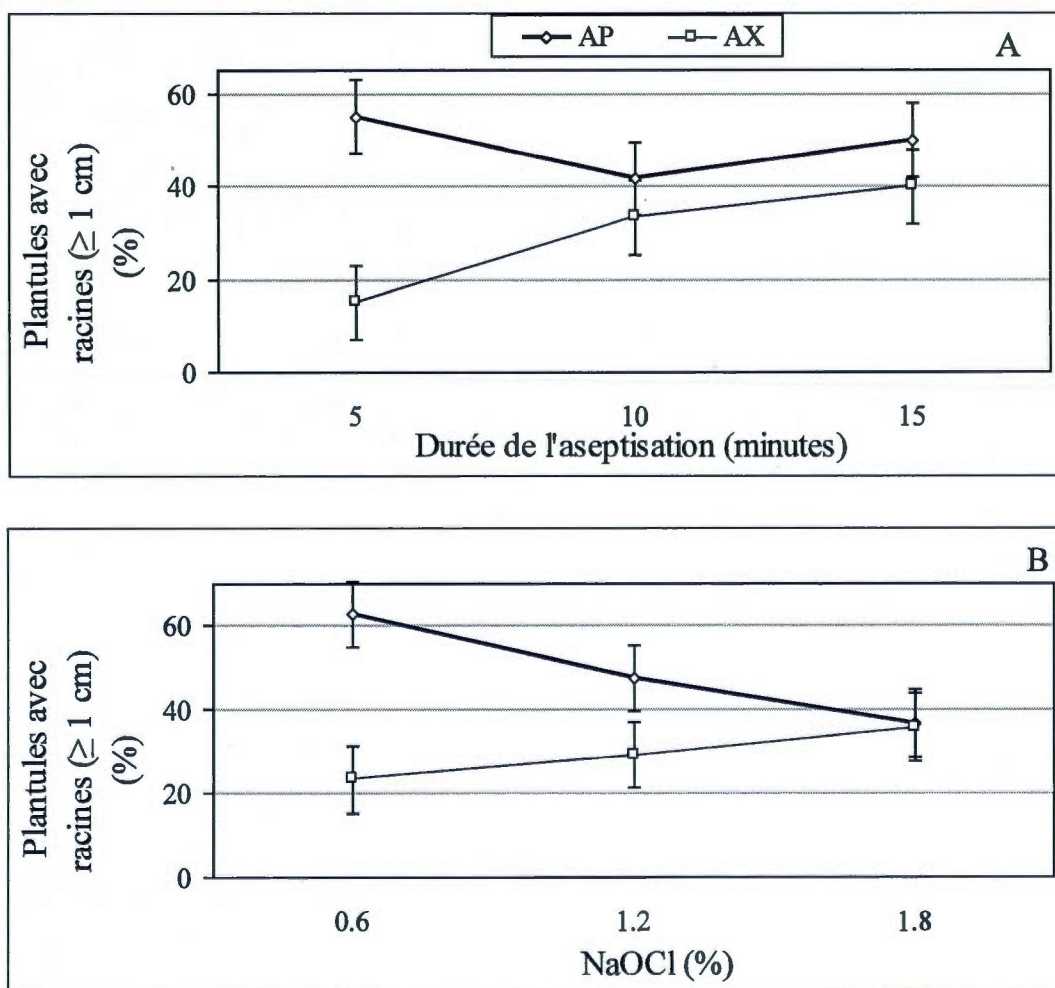


FIGURE 4.6 Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm), en fonction (A) de la durée d'aseptisation et (B) du pourcentage de NaOCl. AX, plantules issues d'un bourgeon axillaire; AP, plantules issues d'un bourgeon apical. La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

4.6 BIBLIOGRAPHIE

- Addinsoft 2007. XLSTAT software. Release 2007. New York, NY, Addinsoft U.S.A
- Alconero R. 1988. Lettuce (*Lactuca sativa* L.). In Bajaj YPS (ed) «Biotechnology in agriculture and forestry». Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer, vol 6. Crops II p 351-369.
- Asghar S., T. Ahmad, I.A. Hafiz et M. Yaseen. 2011. «*In vitro* propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white». *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no 16, p. 3097-3103.
- Bloksberg L.N. et M.E.J. Salveit. 1986. «Regeneration of plants from axillary buds of harvested and stored heads of field-grown Iceberg lettuce». *Hortscience*, vol. 21, no 5, p. 1201-1203.
- Cerioni L., V.A. Rapisarda, M. Hilal, F.E. Prado et L. Rodriguez-Montelongo. 2009. «Synergistic antifungal activity of sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, and cupric sulfate against *Penicillium digitatum*». *Journal of Food Protection*, vol. 72, no 8, p. 1660-1665.
- Dodds J.H. et L.W. Roberts. 1982. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge: Cambridge University, 178 p.
- Doerschug M.R. et C.O. Miller. 1967. «Chemical Control of Adventitious Organ Formation in *Lactuca sativa* Explants». *American Journal of Botany*, vol. 54, no 4 (april), p. 410-413.
- Jenni S., F. Loukili et B.E. Moghaddam. 2006. «*In vitro* culture response of apical and axillary shoot-tips excised from crisphead lettuce cores depends on head maturity, not storage time». *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, vol. 42, no May-June, p. 274-277.
- Koevary K., L. Rappaport et L.L. Morris. 1978. «Tissue culture propagation of head lettuce». *Hortscience*, vol. 13, no 1, p. 39-41.
- Kyte L. 1987. *Plants From Test Tubes: An Introduction to Micropropagation* Revised. Portland, Oregon Timber Press Inc., 160 p.
- Maina S.M., Q. Emongor, K.K. Sharma, S.T. Gichuki, M. Gathaara et S.M. de Villiers. 2010. «Surface sterilant effect on the regeneration efficiency from cotyledon explants of groundnut (*Arachis hypogea* L.) varieties adapted to eastern and Southern Africa». *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no 20, p. 2866-2871.

- Murashige T. et F. Skoog. 1962. «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures». *Plant Physiology*, vol. 15, p. 473-497.
- Pierik R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Dordrecht, Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 344 p.
- Pink D.A.C. 1992. *Micropropagation of lettuce (Lactuca sativa L.)*. Coll. «Biotechnology in Agriculture and Forestry», no High-Tech and Microporpagation III. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 42 - 57 p.
- Pink D.A.C. et P.J. Carter. 1987. «Propagation of lettuce (*Lactuca sativa*) breeding material by tissue culture». *Annals of Applied Biology* vol. 110, no 3, p. 611- 616.
- SAS Institute Inc. 1999. *The SAS system for Windows*, Release 8.2. Cary, N.C.: SAS Institute
- Stafford A. et G. Warren. 1991. *Plant Cell and Tissue Culture*. Institute of Biology. Milton Keynes, UK: Open University Press 251p.
- Yildiz M. et C. Er. 2002. «The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*)». *Naturwissenschaften*, vol. 89, p. 259-261.

CHAPITRE V

EFFET DE TRAITEMENTS ANTIOXYDANTS TELS QUE L'OBSCURITÉ, LE POLYVINYLPYRROLIDONE, L'ACIDE CITRIQUE ET L'ACIDE ASCORBIQUE SUR LA RÉGÉNÉRATION *IN VITRO* DE PLANTULES DE LAITUE (*LACTUCA SATIVA* L. CV. RAIDER)

RÉSUMÉ

Le brunissement des tissus et du milieu de culture est un problème récurrent en culture *in vitro*. Dans cette étude, trois types de traitements antioxydants couramment utilisés pour contrer l'exsudation et l'oxydation des composés phénoliques ont été employés, pour la première fois, sur des explantats de laitue (*Lactuca sativa* L.) issus de bourgeons axillaires. Il s'agit de l'application d'une période d'obscurité aux explantats en début de culture (5, 7 et 9 jours), le trempage et la taille des explantats dans une solution d'acide citrique et d'acide ascorbique, et le trempage dans une solution et/ou la mise en culture dans un milieu contenant du polyvinylpyrrolidone (PVP : 12.5 μ M et 50 μ M). A l'exclusion d'un traitement au PVP (PTM50, indice de 3.2, $p < 0.01$), tous les autres n'étaient pas significativement différents du témoin (indice 1.3, $p < 0.01$) au niveau de l'indice d'opacité du milieu de culture. Il est possible que ce soit en raison d'une durée d'exposition trop courte des explantats aux traitements. Parmi les autres variables qui ont été retenues, la période d'obscurité pendant 7 et 9 jours, ainsi que les deux traitements impliquant l'utilisation des acides ascorbique et citrique, ont favorisé la régénération d'un plus grand pourcentage d'explantats en plantules pourvues d'au moins une racine ≥ 1 cm (99.9, 89.9, 89.9 et 79.9%, $p < 0.0001$). Ces pourcentages sont significativement supérieurs à ceux de tous les traitements impliquant l'utilisation de 50 μ M PVP (13.7, 15 et 29.9%, $p < 0.0001$). En ce qui concerne le nombre de feuilles produites, le fait de tailler l'explantat dans une goutte d'une solution composée d'acide ascorbique et d'acide citrique a favorisé le développement d'un plus grand nombre de feuilles (1.8) que le témoin (0) ainsi que les traitements d'obscurité pendant 5 jours (0) et les deux traitements de trempage au PVP à 12.5 μ M et 50 μ M (0 - 0.1). La taille de l'explantat dans une goutte de ces acides est à considérer puisque ce traitement est facile à appliquer.

MOTS CLÉS

Lactuca sativa L., *in vitro*, culture de bourgeons, acide ascorbique, acide citrique, polyvinylpyrrolidone, obscurité, composés phénoliques, antioxydant.

5.1 INTRODUCTION

La laitue est devenue une filière présentant un fort potentiel de croissance dans l'industrie des produits coupés frais. La commercialisation de ce type de produit présente certaines difficultés, dues au fait que les feuilles coupées se détériorent plus rapidement que les feuilles intactes en raison du brunissement interne et externe des tissus coupés. En culture *in vitro*, le brunissement des tissus est aussi un problème, puisqu'il peut, entre autres, causer la mort de l'explantat. Ce phénomène se produit suite à l'oxydation des composés phénoliques en o-quinones, légèrement colorés, puisque l'exsudation des phénols de la vacuole, entraîne une réaction avec l'air et la phénol oxydase, située dans les plastes (Pati *et al.*, 2006; Altunkaya et Gökmen, 2009; Mulabagal *et al.*, 2010). D'autres recherches ont démontré que ce brunissement peut se produire même en absence d'enzymes par autooxydation de certaines catégories de polyphénols. Les flavonoïdes, les tannins, les lignines et l'acide salicylique font partie de cette vaste gamme de produits très présents dans les tissus des plantes à fleurs, des fougères, des Lophozia ainsi que dans plusieurs microorganismes. La biosynthèse des composés phénoliques se fait à partir de la phénylalanine. Le principal enzyme qui catalyse cette réaction est la phénylalanine ammonia lyase dont l'expression est régulée par plusieurs facteurs tels que la lumière, la nutrition et les pathogènes (Buchanan *et al.*, 2000; Taiz et Zeiger, 2010). Des traitements d'étiollement peuvent réduire le brunissement des tissus en inhibant la synthèse des composées phénoliques (Krishna *et al.*, 2008). Dans le même ordre d'idée, les expériences d'Altunkaya et Gökmen (2009) ont démontré que l'acide ascorbique protège efficacement les composés phénoliques de l'oxydation, et que l'acide citrique prévient le brunissement chez la laitue. Or les deux produits peuvent aussi être utilisés simultanément en tant que solution antioxydante (Sigma Bioscience, 1996; Krishna *et al.*, 2008). L'utilisation du polyvinylpyrrolidone comme prétraitement et dans le milieu de culture a permis de réduire le brunissement lors de la régénération *in vitro* d'explantats de mangue (Krishna *et al.*, 2008). Parmi les effets bénéfiques des composés phénoliques, mentionnons leur action antioxydante et leur implication dans le système de défense de la plante contre les pathogènes (Pati *et al.*, 2006; Altunkaya et Gökmen, 2009).

Nos expériences précédentes ont montré que les plantules de laitue issues de bourgeons axillaires présentaient un indice d'opacité du milieu plus élevé et un pourcentage

de régénération plus faible que celles provenant des bourgeons apicaux. Cette observation nous a incité à trouver une façon de réduire le brunissement des tissus, en utilisant les explantats issus de bourgeons axillaires afin que les différences soient plus faciles à discerner. L'objectif de ce projet étant d'identifier le traitement d'antioxydant qui pourrait favoriser un plus fort pourcentage de survie des plantules de laitue régénérées *in vitro* à partir de bourgeons axillaires. Pour ce faire, trois catégories de traitements couramment utilisés contre l'oxydation des composés phénoliques ont été appliquées: l'obscurité, le polyvinylpyrrolidone (PVP) et une solution combinant les acides ascorbique et citrique.

5.2 MATÉRIEL ET MÉTHODES

5.2.1 Matériel végétal

Des cœurs de laitue de type pommée (*Lactuca sativa* L. cv. Raider) provenant de la compagnie Vegpro, récoltés au mois d'octobre 2009, ont été utilisés. Les cœurs ont été prélevés et entreposés à 2 °C pendant 10 jours, avant l'extraction des explantats pour la mise en culture.

5.2.2 Prélèvement, aseptisation et excision des explantats

Au plus trois bourgeons axillaires ainsi que les tissus sous-jacents ont été extraits de chaque cœur, à l'aide d'un emporte-pièce en cuivre de 1 cm de large et 2.5 cm de long. Les explantats furent aseptisés par immersion avec agitation dans de l'hypochlorite de sodium à 0.9 % de concentration, auquel une goutte de Tween 80 (Fisher Scientific BP338-500) par 100 ml a été ajoutée, pendant 15 minutes. Ensuite ils ont subi trois rinçages successifs de 5 minutes chacun dans de l'eau nanopure stérile (autoclavée pendant 20 minutes à 103.3 kPa et 121 °C). Avant la mise en culture, les explantats ont été taillés, selon une coupe carrée de 6 mm de long, en conditions stériles, afin d'enlever les couches de tissus endommagés au cours de l'étape d'aseptisation.

5.2.3 Milieux de culture

Les explantats ont été mis en culture sur un milieu de base Murashige et Skoog (1962) renfermant du saccharose (30 g/l), de l'agar (8 g/l, de type Bacto, Sigma M9274) et 4.92 µM d'AIB (Sigma 15386-25G). Une série de milieux contenait également du polyvinylpyrrolidone soluble (PVP) (Sigma PVP40T) (section 5.2.4). Les milieux nutritifs furent versés dans des tubes de 25 x 150 mm (12 ml/tube) scellés avec des bouchons Kim Kap et le tout stérilisé à l'autoclave à 103.3 kPa et 121 °C, pendant 20 minutes. Aucun des explantats n'a été repiqué au cours de cette expérience. Ils ont été maintenus sur le même milieu pendant 6 semaines.

5.2.4 Traitements antioxydants

Cette expérience compte au total 12 traitements (tabl.5.1) visant à réduire le brunissement des tissus de l'explantat.

Une première série de traitements a consisté à soumettre (sous la hotte à flux laminaire) les explantats aseptisés et taillés à un trempage de 5 minutes, ou à les tailler directement, dans une solution antioxydante. Cette dernière renfermait 0.1 g/l d'acide L-ascorbique (Sigma; A-2174) préalablement dissous dans une goutte d'éthanol, combiné à 0.15 g/l d'acide citrique anhydre (Sigma A-2174 C-4540), préalablement dissous dans du NaOH 1 M. Après la dissolution complète des sels, le mélange a été stérilisé à l'aide d'un filtre (0.22 μm), puis le volume fut complété à 200 ml avec de l'eau nanopure autoclavée, pour une concentration finale de 568 μM et 781 μM respectivement.

Dans une seconde série, le trempage a été effectué dans une solution de PVP à 0.5 % ou 0.2 %, soit 12.5 μM et 50 μM respectivement, préparée dans de l'eau nanopure et stérilisée aussi à l'aide d'un filtre (0.22 μm).

Une troisième série a impliqué l'incorporation de PVP dans le milieu de culture, aux mêmes concentrations et combinée ou non au trempage dans le PVP.

Enfin, dans une quatrième série de traitements, les explantats en culture ont été gardés à l'obscurité pendant une période de 5, 7 ou 9 jours.

5.2.5 Conditions environnementales dans la chambre de culture *in vitro*

La température moyenne était de 12 °C la nuit et 16 °C le jour. La photopériode de 16 heures à 80 $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ a été assurée par des néons de 48'', 40 W (F40/ agro de Philips, Wesco, Saint-Jean-sur-Richelieu).

5.2.6 Dispositif expérimental

L'expérience a été conçue sous forme d'un dispositif aléatoire, où chaque individu représentait une répétition à raison de 10 individus par traitement. Le bilan des traitements est le suivant :

12 traitements X 10 tubes par traitement (unité expérimentale) = 120 tubes ou répétitions.

Au moins 40 cœurs de laitue ont été utilisés pour réaliser cette expérience.

5.2.7 Variables mesurées

Afin de comparer les différences entre les traitements, un certain nombre de variables quantitatives et qualitatives ont été relevées à la 6^e semaine en culture. Les chiffres des codes se réfèrent à la semaine de culture pendant laquelle le relevé a été effectué. Les variables qualitatives sont évaluées comme l'absence (0) ou la présence (1) du phénomène indiqué, ou son ampleur (de 0 à 5) (cf. liste des abréviations).

Les variables quantitatives comprenaient : nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites (nofe6), nombre de racines (≥ 1 cm) produites (nora6), longueur de la plus longue feuille (tfe6) et diamètre maximal du cal à la base des tiges (cal6, en mm), pourcentage de mortalité (mort6), pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges (calb6), pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges (calv6), pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube (con6), pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (viab6 : 0 = absence de feuille et/ou de racine ≥ 1 cm et 1 = présence d'au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm) et pourcentage de plantules viables montrant la présence d'exsudat à la base des tiges (exupl6), pourcentage de production d'exsudat (exu6), pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) (fe6), pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) (ra6), [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] (ratioRF6).

Les variables qualitatives étaient l'indice d'opacité du milieu de culture (io6 : 0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) et l'indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) (iopl6).

Les pourcentages de mortalité, de contamination, de régénération en plantules viables, le pourcentage d'explantats montrant la présence d'exsudat (exu6), d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) et d'au moins une racine (≥ 1 cm), ainsi que l'indice d'opacité du milieu de culture, ont été relevés sur l'ensemble des tubes et calculés par rapport au nombre initial d'explantats mis en culture. Les autres variables ont été relevées sur les plantules viables régénérées et leurs pourcentages établis par rapport à ces dernières.

5.2.8 Analyse statistique

Dans un premier temps, une analyse 'biplot' a été faite en utilisant le logiciel de traitement de données XLSTAT (Addinsoft, 2007), afin d'identifier les variables corrélées entre elles (Analyse du coefficient de corrélation de Pearson) et de visualiser comment les traitements se positionnent par rapport au regroupement des variables corrélées. La représentation graphique à la fois des variables et des traitements a été faite en suivant les deux axes principaux (F1 et F2) des variations.

Cette analyse 'biplot' a aussi fourni le tableau de corrélation des variables permettant de chiffrer l'importance de la variation de chacune des variables en fonction de chacun des axes F1 et F2. Parallèlement nous avons aussi obtenu le tableau mesurant la contribution de chacun des traitements aux axes F1 et F2, permettant de mesurer l'affinité de chacun des traitements pour l'un ou l'autre de ces axes. L'analyse et la comparaison de ces trois documents devraient permettre la mise en évidence des traitements qui étaient étroitement liés aux variables d'intérêt pour cette étude.

Dans un premier temps, une analyse en composantes principales (ACP) a été faite en utilisant le logiciel de traitement de données XLSTAT (Addinsoft, 2007), afin d'identifier les variables corrélées entre elles (Analyse du coefficient de corrélation de Pearson) et de sélectionner, parmi les variables mesurées pour les traitements antioxydants, un sous-ensemble de variables pour les analyses subséquentes.

Par la suite, une analyse de variance a été effectuée avec les résultats obtenus, en utilisant la procédure GLM (SAS Institute Inc, 1999), mettant en évidence des différences significatives entre les traitements d'antioxydants.

Le modèle linéaire a été ajusté, pour chacune des répétitions, en faisant la moyenne des variables numériques et le pourcentage des variables binaires. Au besoin, certaines données ont été transformées, par la fonction racine carrée et logarithmique, pour satisfaire à l'homogénéité de variances, ainsi qu'à l'homoscédasticité et la normalité de distribution des résidus. Ces valeurs ont été représentées graphiquement à l'aide de barres représentant 95 % de l'intervalle de confiance.

5.3 RÉSULTATS

Les deux premiers axes du biplot (fig.5.1) expliquent 98.46 % de la variabilité du jeu de données à l'étude, et ont servi à localiser les traitements ayant le plus d'affinités avec ces axes F1 et F2 (tabl.5.3). Des corrélations significatives ont été mises en évidence (tabl.5.4) et identifiables sur le biplot.

Ainsi les variables (tabl.5.2) nombre de racines produites 'nora6' (0.91), diamètre maximal du cal (0.98), pourcentage de cal de type brun (0.90) ainsi que nombre de feuilles produites 'nofe6' (0.97), longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule (0.99), pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) 'fe6' (0.80) et pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm) (0.91) étaient les plus fortement positivement corrélées à l'axe F1 (fig.5.1) qui décrit 93.58 % de la variation. Alors que les variables mesurant les plantules en difficulté, le pourcentage de mortalité 'mort6' (-0.31) et du pourcentage de production d'exsudat présent dans le milieu 'exu6' (-0.64), étaient négativement corrélées à ce même axe F1. En ce qui concerne l'axe F2 qui décrit seulement 4.88 % de la variation, le ratio entre le nombre total de feuilles sur le nombre total de racines produites par plantule viable 'viab6' (0.79) et le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine 'ra6' (≥ 1 cm) (0.57) étaient les deux variables qui avaient les plus fortes corrélations positives à cet axe.

Pour ce qui est de la contribution des traitements (tabl.5.3) à chacun des axes F1 et F2, les traitements AG (57.68 %) et ANT (18.40 %) sont les deux à avoir le plus fortement contribué à l'axe F1 et pour l'axe F2 il s'agit des traitements OBS9 (35.53 %) et PTM50 (18.33 %). Tous les autres traitements ont participé à l'un ou l'autre ou aux deux axes mais à de plus faibles pourcentages.

L'analyse de la matrice de corrélation de Pearson (tabl.5.4) a permis de chiffrer la corrélation existant entre certaines des variables. À l'égard des variables mesurées sur l'état de santé des plantules, le pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables 'viab6' était fortement et positivement corrélé au ratio du nombre total de racines sur le nombre total de feuilles produites par plantule viable 'ratioRF6' ($r = 0.74^{****}$), au pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges 'calb6' ($r = 0.96^{****}$), à l'indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque) 'iop6' ($r = 0.66^{****}$),

au pourcentage de cal de type vert 'calv6' ($r = 0.24^{**}$) et au pourcentage de plantules viables montrant la présence d'exsudat à la base des tiges (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat) 'exupl6' ($r = 0.34^{***}$).

Pour ce qui est des variables mesurées sur les feuilles, le nombre de feuilles 'nofe6' était fortement et positivement corrélé à la longueur de la plus longue feuille de la plantule 'tfe6' ($r = 0.93^{****}$), au nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules 'nora6' ($r = 0.86^{****}$), au diamètre maximal (en mm) du cal, à la base des tiges 'cal6' ($r = 0.91^{****}$) et au pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) 'fe6' ($r = 0.76^{****}$).

Parmi les variables caractérisant les racines, 'ra6' était négativement corrélé au pourcentage de mortalité 'mort6' ($r = -0.38^{****}$) ainsi qu'au pourcentage de production d'exsudat à la 6^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat) 'exu6' ($r = -0.21^*$).

Les regroupements ci-dessus ont permis d'identifier la variable la plus représentative parmi celles qui sont corrélées entre elles, ce qui a grandement facilité les analyses statistiques et l'interprétation des données. Lors de la sélection, nous avons d'abord priorisé dans un premier temps, les variables quantitatives. Ensuite, les paramètres faisant référence à des organes différents ont été sélectionnés pour enrichir l'analyse globale de l'expérience (ra6, nofe6). Certaines variables ont été préservées bien qu'elles étaient (ou non) corrélées à une autre, parce qu'elles sont importantes pour cette expérience (viab6 et io6). D'autres ont simplement été mises de côté pour éviter la redondance de l'information. Après ce tri, cinq variables ont été retenues pour les analyses de variances, il s'agit de nofe6, ra6, con6, io6, viab6.

L'analyse des résultats (tabl. 5.5) a mis en évidence que les traitements n'ont eu aucun effet significatif sur la viabilité des plantules. Tous les traitements étaient semblables au témoin en ce qui concerne l'indice d'opacité du milieu de culture (fig. 5.2). Toutefois, celui impliquant le trempage et la mise en culture des explantats en présence de 50 μM de PVP était aussi supérieur à 5 autres traitements ($p < 0.01$) : le trempage suivi de la mise en culture sur un milieu avec 12.5 μM de PVP, la mise en culture sur un milieu avec 12.5 et 50 μM de PVP, l'obscurité pendant 9 jours et l'excision dans la goutte des acides ascorbique et citrique.

Au niveau de l'effectif foliaire (fig 5.3), le fait d'effectuer la taille des explantats dans une goutte d'acide ascorbique et d'acide citrique a entraîné une organogénèse foliaire plus prolifique chez les plantules viables issues de ce traitement que chez celles issues de tous les autres traitements à l'exception de trois d'entre eux ($p < 0.05$); il s'agit du trempage dans la solution d'acide ascorbique et d'acide citrique, ainsi que des traitements de trempage suivi de la mise en culture sur un milieu avec 12.5 μM et 50 μM de PVP.

Indépendamment du traitement, le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine ($p < 0.0001$) ne différait pas de celui du témoin (fig.5.4). Par ailleurs il y avait plus d'explantats issues des traitements de taille des explantats dans une goutte d'acide ascorbique et d'acide citrique ayant régénéré une plantule et des traitements à l'obscurité à 7 et 9 jours à avoir produit des racines comparativement aux trois traitements effectués avec 50 μM de PVP, à savoir les traitements de trempage simple, de mise en culture sur milieu avec PVP et la combinaison des deux. Le traitement de trempage dans la solution d'acide ascorbique et d'acide citrique se traduisant par un pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine ($\geq 1 \text{ cm}$) seulement supérieur à ceux de trempage simple (50 μM) et, de trempage (50 μM) suivi de la mise en culture sur milieu avec 50 μM de PVP.

Le pourcentage de contamination dans le milieu de culture différait seulement entre le traitement de mise en culture sur milieu avec 50 μM de PVP et ceux de taille des explantats dans une goutte d'acide ascorbique et citrique et de trempage (12.5 μM) suivi de la mise en culture sur milieu avec 12.5 μM de PVP, le premier étant supérieur (fig.5.5). Les autres traitements n'étaient pas significativement différents en ce qui concerne leurs pourcentages de contamination ($P < 0.05$).

La figure 5.6 documente une différence de croissance en présence ou absence de phénols oxydés.

5.4 DISCUSSION

5.4.1 Effet de l'acide ascorbique et de l'acide citrique

L'acide ascorbique est un agent réducteur qui n'inhibe pas directement la polyphénol oxydase. Son mode d'action consiste plutôt à réduire l'o-quinone, qui est formée par cet enzyme, en sa conformation originale qui est le diphénol. A travers ce processus qualifié de « réaction deactivation », l'acide ascorbique peut limiter le brunissement des feuilles de laitue (Altunkaya et Gökmen, 2009). L'acide citrique quant à lui inhibe la polyphénol oxydase en réduisant le pH ($4 \geq$), et le pH acide lui permet d'interagir avec la molécule de cuivre qui se trouve sur le site actif de l'enzyme. Ces deux actions se font de façon simultanée pour protéger les composés phénoliques d'une oxydation potentielle (Altunkaya et Gökmen, 2009). Ces deux acides ont été utilisés séparément sur des extraits de feuilles de laitue. Les résultats indiquent qu'ils sont tous les deux capables de réduire le brunissement enzymatique, quoique l'acide ascorbique soit plus efficace (Altunkaya et Gökmen, 2009). Dans notre étude, ils ont été utilisés simultanément en solution antioxydante dans deux traitements, à savoir l'immersion de l'explantat pendant 5 minutes et la taille de l'explantat dans une goutte de cette même solution. L'analyse des variables mesurées sur les plantules régénérées a démontré que l'indice d'opacité du milieu de culture, le pourcentage de plantules ayant produit au moins une racine ainsi que le pourcentage de contamination n'étaient pas significativement différents entre ces deux traitements, ni entre ces traitements et le témoin. Or, les deux acides sont capables de réduire l'activité des enzymes responsables, de près ou de loin, du brunissement des tissus à savoir la polyphénol oxydase, la peroxydase et la phénylalanine ammonia lyase, tel qu'observé par Krishna *et al.* (2008) dans des cultures de manguiers. A part le fait que ces auteurs ont fait usage d'un tissu ligneux, la grande différence qui existe entre leurs travaux et ce projet est la durée d'exposition au produit antioxydant. En effet les bourgeons de manguiers sont restés immergés pendant 1.5 heure sous agitation. Il est possible que les 5 minutes de traitement que nous avons appliquées aient été insuffisantes pour induire une différence avec le témoin.

Toutefois, la taille des explantats dans cette solution a entraîné une plus forte organogénèse foliaire comparativement aux plantules témoins alors que l'augmentation suite au simple trempage n'était pas significative. Les explantats ayant été en contact avec la

solution antioxydante avant même que la taille des tissus ne débute, il est possible que cet effet positif soit relié à la rapidité d'inhibition des effets néfastes de l'oxydation. Cette hypothèse est appuyée par la très forte contribution (57.7%) du traitement de coupe dans l'acide citrique et ascorbique pour l'axe F1 du biplot, lui-même fortement corrélé aux variables liées à la viabilité des plantules. Il est suivi du traitement de trempage dans ces mêmes acides (18.4%).

5.4.2 Effet du PVP

Le PVP a été utilisé pour adsorber les substances phénoliques lors de la multiplication de *Cycas revoluta* à partir d'endosperme (Kiong *et al.*, 2008). Dans notre expérience, le fait d'avoir utilisé le PVP à deux concentrations (12.5 μ M et 50 μ M) pour effectuer trois types de traitements distincts (trempage, incorporation dans le milieu de culture et les deux en même temps) n'a pas induit d'amélioration en ce qui a trait à l'opacité du milieu de culture. Bien au contraire, le traitement de trempage suivi de la mise en culture sur un milieu contenant 50 μ M de PVP, a induit un indice d'opacité significativement supérieur à celui du témoin et de 4 traitements ($p < 0.01$). De plus, certaines manipulations impliquant le PVP ont affecté négativement le pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine comparativement au témoin. Ceci peut être dû au fait que l'ajout de PVP cause une réduction de la concentration des régulateurs de croissance disponibles, parce qu'ils sont adsorbés par celui-ci (Kiong *et al.*, 2008).

5.4.3 Effet de l'obscurité

La lumière affecte la morphogenèse des végétaux de plusieurs façons, en plus de son implication dans la photosynthèse; c'est le phénomène de la photomorphogénèse. Elle stimule chez la plante la production des pigments anthocyanes ainsi que d'autres flavonoïdes au niveau des cellules spécialisées des tissus de la plantes (Salisbury et Ross, 1992). À titre d'exemple, les anthocyanes sont des glycosides phénoliques solubles dans l'eau, impliqués dans la coloration des fruits, des fleurs, des légumes et des céréales (Mulabagal *et al.*, 2010). Dans les feuilles de *Gnaphalium luteo-album*, il a été mis en évidence que la biosynthèse des composés phénoliques se fait en réaction à la lumière, plus précisément aux rayons UV-B du spectre lumineux (Cuadra *et al.*, 1997). Étroitement liée à la production et l'oxydation des

composés phénoliques, l'activité enzymatique de la polyphenoloxydase s'accroît en présence de lumière. Krishna *et al.* (2008) l'ont démontré chez le manguier, en isolant de la lumière pendant 7 jours les bourgeons nouvellement formés qui ont été utilisés comme explantats. Il en résulte une plus faible exsudation de composés phénoliques chez les explantats étiolés comparativement au témoin, qui serait due à une plus faible concentration de composés phénoliques au niveau de l'explantat *in vivo*. Dans notre étude, les traitements à l'obscurité en début de culture n'ont pas eu d'effets significativement différents par rapport au témoin pour toutes les variables retenues, particulièrement l'indice d'opacité du milieu. Des résultats similaires ont été rapportés avec *Ilex paraguariensis*, puisque ni l'étiollement de la plante-mère, ni la variation de l'intensité lumineuse pendant la période de culture *in vitro* n'ont pu réduire le brunissement (Mroginski *et al.*, 1999). Chez l'Érable à sucre (*Acer saccharum*), la combinaison de traitements de trempage des explantats dans une solution d'acide citrique et d'acide ascorbique et d'exposition initiale à l'obscurité pendant la culture, serait même à l'origine du faible taux de survie de ces derniers (Brassard *et al.*, 2003).

5.5 CONCLUSION

À la lumière de ce qui a été dit précédemment, l'on peut émettre l'hypothèse que la durée d'exposition des explantats aux traitements antioxydants était insuffisante pour faire ressortir des différences significatives. L'étude a tout de même permis d'identifier le traitement de taille des explantats dans une goutte d'acide ascorbique et d'acide citrique comme étant à considérer puisqu'il favorise l'organogénèse foliaire, en plus de sa facilité d'utilisation. Il serait intéressant de reprendre cette expérience en augmentant la durée d'exposition des explantats aux traitements antioxydants, et en incorporant de l'acide citrique et de l'acide ascorbique dans le milieu de culture des explantats ayant subi un trempage dans ces mêmes acides.

TABLEAU 5.1 Combinaisons des traitements

Traitement ^z	Obscurité (jours)	Trempe 5 minutes (μ M)	PVP		Acide ascorbique et acide citrique	
			Dans le milieu (μ M)	Trempe 5 minutes	Dissection dans une goutte	
TEM	-	-	-	-	-	-
OBS5	5	-	-	-	-	-
OBS7	7	-	-	-	-	-
OBS9	9	-	-	-	-	-
PT12.5	-	12.5	-	-	-	-
PTM12.5	-	12.5	12.5	-	-	-
M12.5	-	-	12.5	-	-	-
PT50	-	50	-	-	-	-
PTM50	-	50	50	-	-	-
M50	-	-	50	-	-	-
AT	-	-	-	oui	-	-
AG	-	-	-	-	-	Oui

^zTEM = Témoins, explantats n'ayant subi aucun traitement; OBS5 = Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 5 jours; OBS7 = Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 7 jours; OBS9 = Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 9 jours; PT12.5 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5 % (12.5 μ M); PTM12.5 =

Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5 % (12.5 μ M), ensuite mise en culture sur un milieu contenant aussi du PVP à 0.5 %; M12.5 = Coupe des explantats puis mise en culture sur un milieu contenant du PVP à 0.5 % (12.5 μ M); PT50 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 2 % (50 μ M); PTM50 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 2 % (50 μ M ou 2 g/l), ensuite mise en culture sur un milieu contenant aussi du PVP à 2 %; M50 = Coupe des explantats puis mise en culture sur un milieu contenant du PVP à 2 % (50 μ M); AT = Coupe des tissus sous-jacents puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution d'acide ascorbique 0.1 g/l et d'acide citrique 0.15 g/l; AG = Coupe des explantats effectuée directement dans une solution d'acide ascorbique 0.1 g/l et d'acide citrique 0.15g/l.

TABLEAU 5.2 Tableau de corrélation des variables avec les axes F1 et F2 du biplot

Variables ^y	F1 ^z	F2
mort6	-0.31	-0.34
nofe6	0.97	0.01
tfe6	0.99	-0.11
nora6	0.91	0.41
cal6	0.98	0.13
calb6	0.90	0.08
calv6	-0.15	0.09
io6	-0.32	-0.50
iopl6	0.27	-0.30
con6	-0.23	-0.23
exu6	-0.64	-0.27
exupl6	0.02	-0.01
fe6	0.80	0.05
ra6	0.30	0.57
viab6	0.91	0.11
ratioRF	0.02	0.79

^z F1 et F2 sont les axes principaux représentant 98.46 % de la variation des variables.

^y mort6 = Pourcentage de mortalité à la 6^e semaine; nofe6 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; tfe6 = Longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule à la 6^e semaine; nora6 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; cal6 = Diamètre maximal (en mm) du cal, à la base des tiges, à la 6^e semaine; calb6 = Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 6^e semaine; calv6 = Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 6^e semaine; io6 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); iopl6 = Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); con6 = Contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 6^e semaine; exu6 = Pourcentage de production d'exsudat à la 6^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat); exupl6 = Pourcentage de plantules viables montrant la présence d'exsudat à la base des tiges à la 6^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat); fe6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ra6 = Pourcentage

d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; $viab6$ = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), à la 6^e semaine; $ratioRF6$ = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine.

TABLEAU 5.3 Tableau présentant la contribution (%) de chacun des traitements aux axes F1 et F2 du biplot

Traitements ^y	F1 ^z	F2
TEM	5.7	0.4
OBS9	0.5	35.5
OBS5	5.7	0.6
OBS7	1.7	14.8
PT1	5.8	1.3
PM1	0.6	0.4
PT1M1	0.2	0.5
PT2	2.1	0.7
PM2	1.4	3.5
PT2M2	0.1	18.3
ANT	18.4	18.0
ANTG	57.7	5.9

^z F1 et F2 sont les axes principaux représentant 98.46 % de la variation des variables.

^yTEM = Témoins, explantats n'ayant subi aucun traitement; OBS5 = Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 5 jours; OBS7 = Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 7 jours; OBS9 = Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 9 jours; PT12.5 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5% (12.5 µM); PTM12.5 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5 % (12.5 µM), ensuite mise en culture sur un milieu contenant aussi du PVP à 0.5 %; M12.5 = Coupe des explantats puis mise en culture sur un milieu contenant du PVP à 0.5 % (12.5 µM); PT50 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 2 % (50 µM); PTM50 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 2 % (50 µM ou 2 g/l), ensuite mise en culture sur un milieu contenant aussi du PVP à 2 %; M50 = Coupe des explantats puis mise en culture sur un milieu contenant du PVP à 2 % (50 µM); AT = Coupe des tissus sous-jacents puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution d'acide ascorbique 0.1 g/l et d'acide citrique 0.15 g/l; AG = Coupe

des explantats effectuée directement dans une solution d'acide ascorbique 0.1 g/l et d'acide citrique 0.15 g/l.

TABLEAU 5.4 Matrice de corrélation de Pearson (n-1)

Variables ^z	mort6	nofe6	tfe6	nora6	cal6	calb6	calv6	io6
mort6	1.00							
nofe6	-0.09	1.00						
tfe6	-0.09	0.93****	1.00					
nora6	-0.09	0.86****	0.78****	1.00				
cal6	-0.11	0.91****	0.90****	0.90****	1.00			
calb6	-0.11	0.83****	0.85****	0.77****	0.93****	1.00		
calv6	-0.03	0.05	0.07	0.12	0.13	-0.03	1.00	
io6	0.13	-0.21*	-0.21*	-0.23*	-0.26**	-0.23*	-0.03	1.00
iopl6	-0.07	0.46****	0.50****	0.32***	0.48****	0.61****	0.25**	-0.02
con6	0.02	-0.15	-0.16	-0.15	-0.18	-0.18	-0.05	0.32**
exu6	-0.21*	-0.16	-0.16	-0.18	-0.20*	-0.15	-0.07	0.48****
exupl6	-0.04	0.18*	0.22*	0.09	0.17	0.36****	-0.01	0.05
fe6	-0.12	0.76****	0.78****	0.73****	0.88****	0.89****	0.23*	-0.24**
ra6	-0.38****	0.24**	0.25**	0.23*	0.28**	0.28**	0.07	-0.29**
viab6	-0.11	0.82****	0.84****	0.78****	0.94****	0.96****	0.24**	-0.24*
ratioRF6	-0.08	0.49****	0.49****	0.79****	0.74****	0.67****	0.31**	-0.21*

Variables ^y	iopl6	con6	exu6	exupl6	fe6	ra6	viab6	ratioRF6
mort6								
nofe6								
tfe6								
nora6								
cal6								
calb6								
calv6								
io6								
iopl6	1.00							
con6	-0.12	1.00						
exu6	0.03	0.35****	1.00					
exupl6	0.75****	-0.06	0.19*	1.00				
fe6	0.62****	-0.20*	-0.14	0.32***	1.00			
ra6	0.20*	-0.45****	-0.21*	0.10	0.22*	1.00		
viab6	0.66****	-0.19*	-0.17	0.34***	0.93****	0.30**	1.00	
ratioRF6	0.36****	-0.14	-0.14	0.21*	0.69****	0.22*	0.74****	1.00

^z *, **, ***, **** Significatif à 0.05, 0.01, 0.001, 0.001.

^y mort6 = Pourcentage de mortalité à la 6^e semaine; nofe6 = Nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; tfe6 = Longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule à la 6^e semaine; nora6 = Nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules à la 6^e semaine; cal6 = Diamètre maximal (en mm) du cal, à la base des tiges, à la 6^e semaine; calb6 = Pourcentage de cal de type brun produit à la base des tiges à la 6^e semaine; calv6 = Pourcentage de cal de type vert produit à la base des tiges à la 6^e semaine; io6 = Indice d'opacité du milieu de culture à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); iopl6 = Indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); con6 = Contamination bactérienne ou fongique dans le tube à la 6^e semaine; exu6 = Pourcentage de production d'exsudat à la 6^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat); exupl6 = Pourcentage de plantules viables montrant la présence d'exsudat à la base des tiges à la 6^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat); fe6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; ra6 = Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine; viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), à la 6^e semaine; ratioRF6 = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules viables] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine.

TABLEAU 5.5 Anova du traitement antioxydant

Variables ^z	nofe6	ra6	io6	con6	viab6
AT	0.9 ^{ab}	79.9 ^{abc}	1.5 ^{ab}	9.8 ^{ab}	19.8
AG	1.8 ^a	89.9 ^{ab}	0.8 ^b	0 ^b	39.8
OBS5	0 ^b	69.9 ^{abcd}	1.7 ^{ab}	9.8 ^{ab}	0.1
OBS7	0.1 ^{ab}	99.9 ^a	1.4 ^{ab}	19.8 ^{ab}	9.8
OBS9	0.2 ^{ab}	89.9 ^{ab}	0.9 ^b	9.8 ^{ab}	9.8
PM12.5	0.3 ^{abc}	49.9 ^{abcd}	1.4 ^{ab}	39.8 ^{ab}	19.8
PM50	0.2 ^{ab}	13.7 ^d	0.8 ^b	63.5 ^a	13.5
PT12.5	0 ^b	59.9 ^{abcd}	2.5 ^{ab}	19.8 ^{ab}	0.0
PTM12.5	0.5 ^{abc}	69.9 ^{abcd}	1.1 ^b	0 ^b	19.8
PT50	0.1 ^b	29.9 ^b	1.9 ^{ab}	29.9 ^{ab}	9.8
PTM50	0.4 ^{ab}	15.0 ^c	3.1 ^a	29.2 ^{ab}	13.5
TEM	0 ^b	69.9 ^{abcd}	1.3 ^{ab}	9.9 ^{ab}	0.1
<i>Effets significatifs^y</i>					
Traitement	*	****	**	*	NS

^znofe6 = Nombre moyen de feuilles (≥ 1 cm) produit par les plantules; ra6 = Pourcentage de plantules ayant produit au moins une racine (≥ 1 cm); io6 = Indice d'opacité du milieu de culture (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque); con6 = Pourcentage de contamination bactérienne ou fongique dans le tube et viab6 = Pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), à la 6^e semaine.

^yTEM = Témoins, explantats n'ayant subi aucun traitement; OBS5 = Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 5 jours; OBS7 = Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 7 jours; OBS9 = Explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 9 jours; PT12.5 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5 % (12.5 μ M); PTM12.5 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5 % (12.5 μ M), ensuite mise en culture sur un milieu contenant aussi du PVP à 0.5 %; M12.5 = Coupe des explantats puis mise en culture sur un milieu contenant du PVP à 0.5 % soit 12.5 μ M; PT50 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de polyvinilpyrrolidone à 2 %

soit 50 μ M; PTM50 = Coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 2 % soit 50 μ M (ou 2 g/l), ensuite mise en culture sur un milieu contenant aussi du PVP à 2 %; M50 = Coupe des explantats puis mise en culture sur un milieu contenant du PVP à 2 % (50 μ M); AT = Coupe des tissus sous-jacents puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution d'acide ascorbique 0.1 g/l et d'acide citrique 0.15 g/l; AG = Coupe des explantats effectuée directement dans une solution d'acide ascorbique 0.1 g/l et d'acide citrique 0.15 g/l; trt = traitement

^xNS, *, **, ***, **** Non significatif ou significatif à $p < 0.05$, 0.01, 0.001 et 0.0001 respectivement.

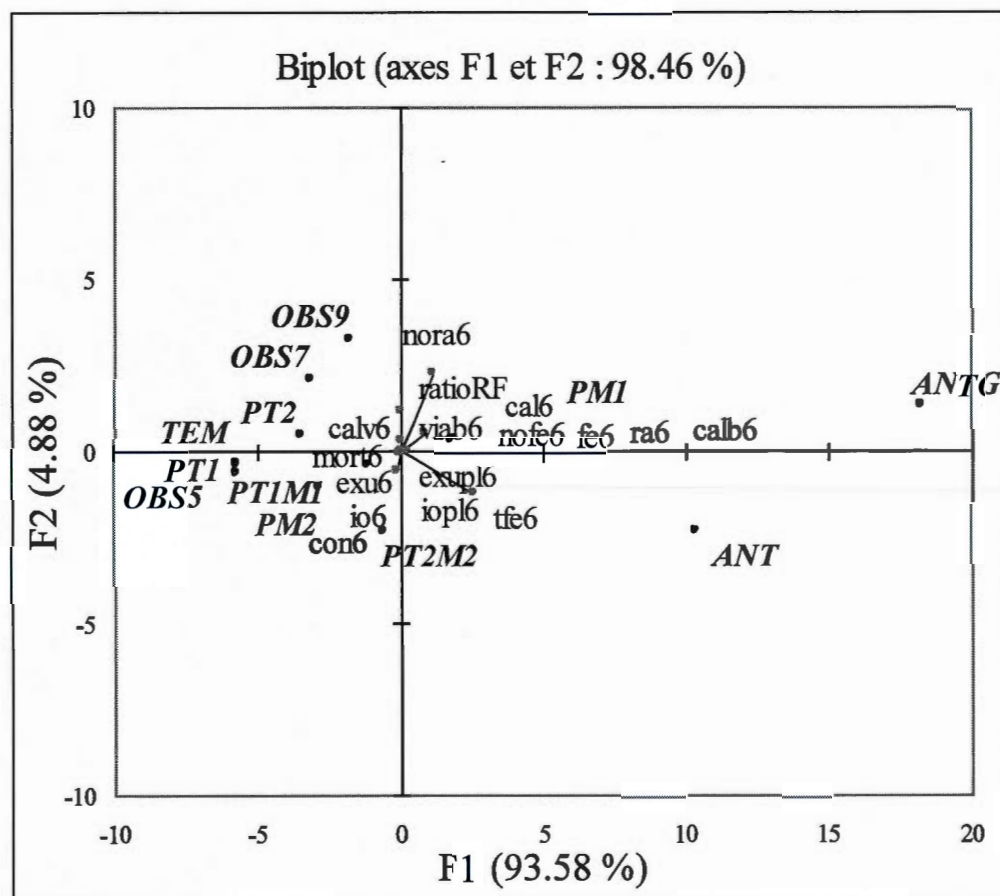


FIGURE 5.1 Représentation graphique du biplot illustrant la variation des variables sur les 2 axes principaux (F1 et F2) en fonction des traitements effectués.

Le biplot illustre à la fois comment les variables varient sur les axes (F1 et F2) et la corrélation qui existe entre elles (plus l'angle est aigu, plus les variables sont corrélées) ainsi que la contribution de chacun des traitements aux axes F1 et F2 en fonction de leur position.

Les variables qui ont été représentées sont : nofe6 = nombre de feuilles (≥ 1 cm) produites par les plantules, nora6 = nombre de racines (≥ 1 cm) produites par les plantules, tfe6 = longueur (en mm) de la plus longue feuille de la plantule, cal6 = diamètre (en mm) maximal du cal à la base des tiges, mort6 = pourcentage de mortalité, calb6 = pourcentage de cal brun à la base des tiges, calv6 = pourcentage de cal vert à la base des tiges, io6 = indice d'opacité du milieu de culture (0 = milieu translucide et 5 = milieu très opaque), iopl6 = indice d'opacité du milieu de culture des plantules viables à la 6^e semaine (0 = milieu

translucide et 5 = milieu très opaque), $con6$ = pourcentage de contamination, $exu6$ = Pourcentage de production d'exsudat à la 6^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat), $exupl6$ = pourcentage de plantules viables montrant la présence d'exsudat à la base des tiges à la 6^e semaine (0 = absence d'exsudat et 1 = présence d'exsudat), $fe6$ = pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une feuille (≥ 1 cm) à la 6^e semaine, $ra6$ = pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm) à la 6^e semaine, $viab6$ = pourcentage d'explantats régénérés en plantules viables (ayant au moins une racine et une feuille ≥ 1 cm), à la 6^e semaine, $ratioRF6$ = [nombre total de racines (≥ 1 cm) produites par plantule viable] / [nombre total de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule viable] à la 6^e semaine.

Les traitements qui ont été représentés sont : témoins, explantats n'ayant subi aucun traitement (TEM), explantats en culture, maintenus à l'obscurité à l'aide d'un sac en plastique noir opaque pendant 5 jours (OBS5), 7 jours (OBS7) et 9 jours (OBS9). Coupe puis trempage des explantats, pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5 % soit 12.5 μ M (PT12.5) et à 2 % soit 50 μ M (PT50), coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5 % (PT12.5) et à 2 % (PT50), coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 0.5 %, ensuite mise en culture sur un milieu contenant aussi du PVP à 0.5 % (PTM12.5), coupe puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution de PVP à 2 %, ensuite mise en culture sur un milieu contenant aussi du PVP à 2 % (PTM50), coupe des explantats puis mise en culture sur un milieu contenant du PVP à 0.5 % (12.5 μ M) et à 2 % (50 μ M). Coupe des tissus sous-jacents puis trempage des explantats pendant 5 minutes, dans une solution d'acide ascorbique 0.1 g/l et d'acide citrique 0.15 g/l (AT). Coupe des explantats effectuée directement dans une solution d'acide ascorbique 0.1 g/l et d'acide citrique 0.15 g/l (AG).

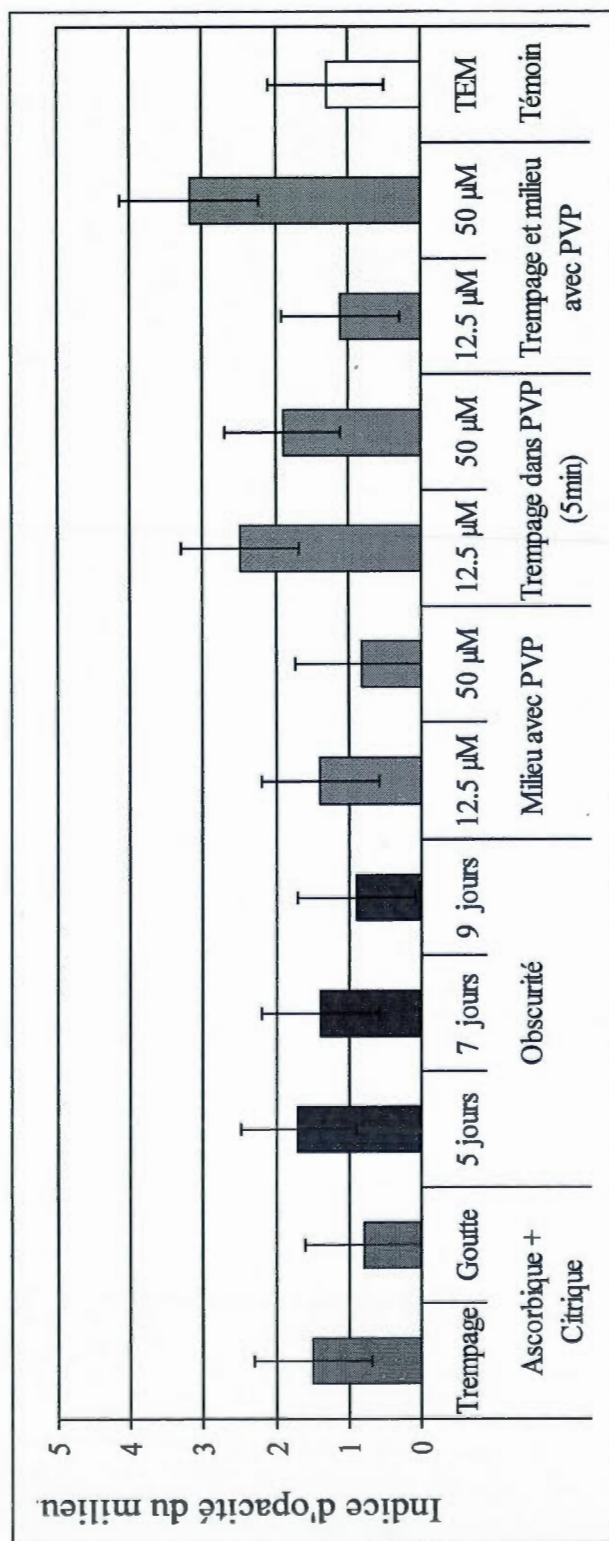


FIGURE 5.2 Indice d'opacité du milieu de culture, en réponse à l'exsudation de composés phénoliques (0 = milieu clair, 5 = milieu très opaque), pour chacun des traitements (acide ascorbique et acide citrique, obscurité et PVP). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

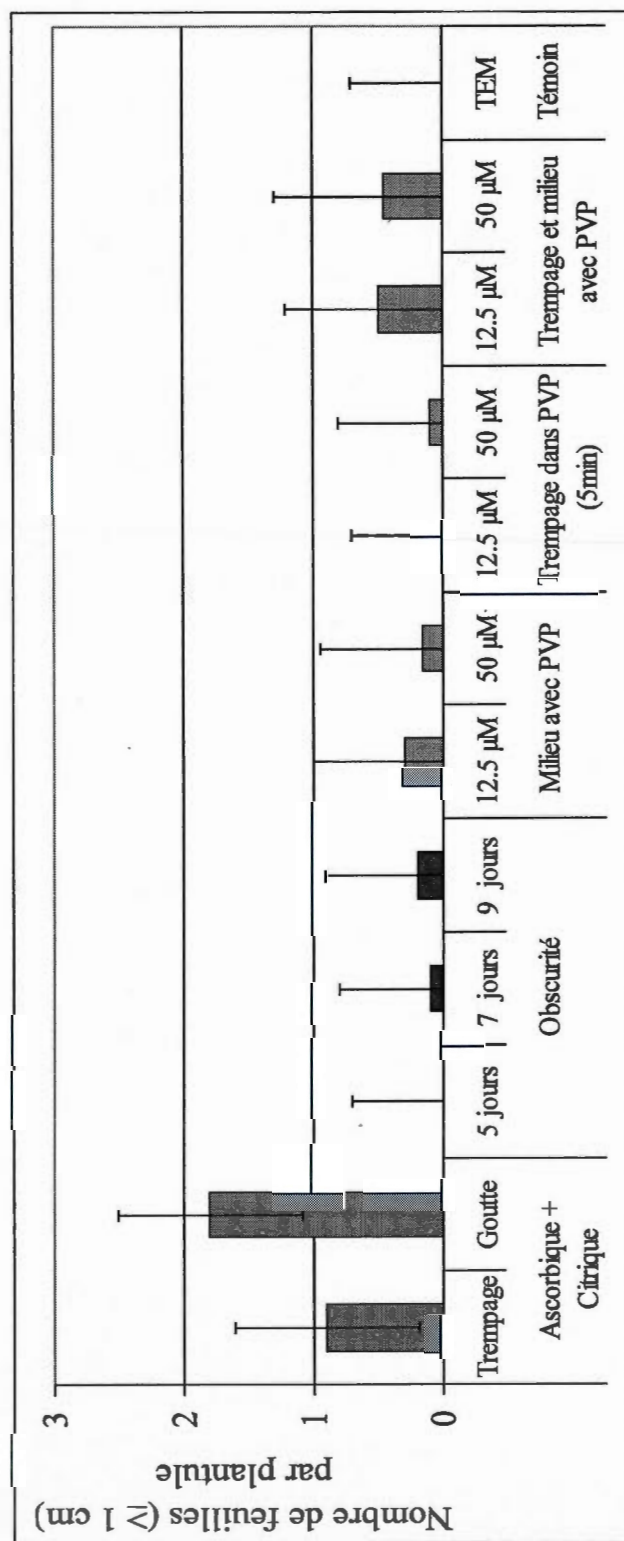


FIGURE 5.3 Nombre moyen de feuilles (≥ 1 cm) produites par plantule, pour chacun des traitements (acide ascorbique et acide citrique, obscurité et PVP). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.

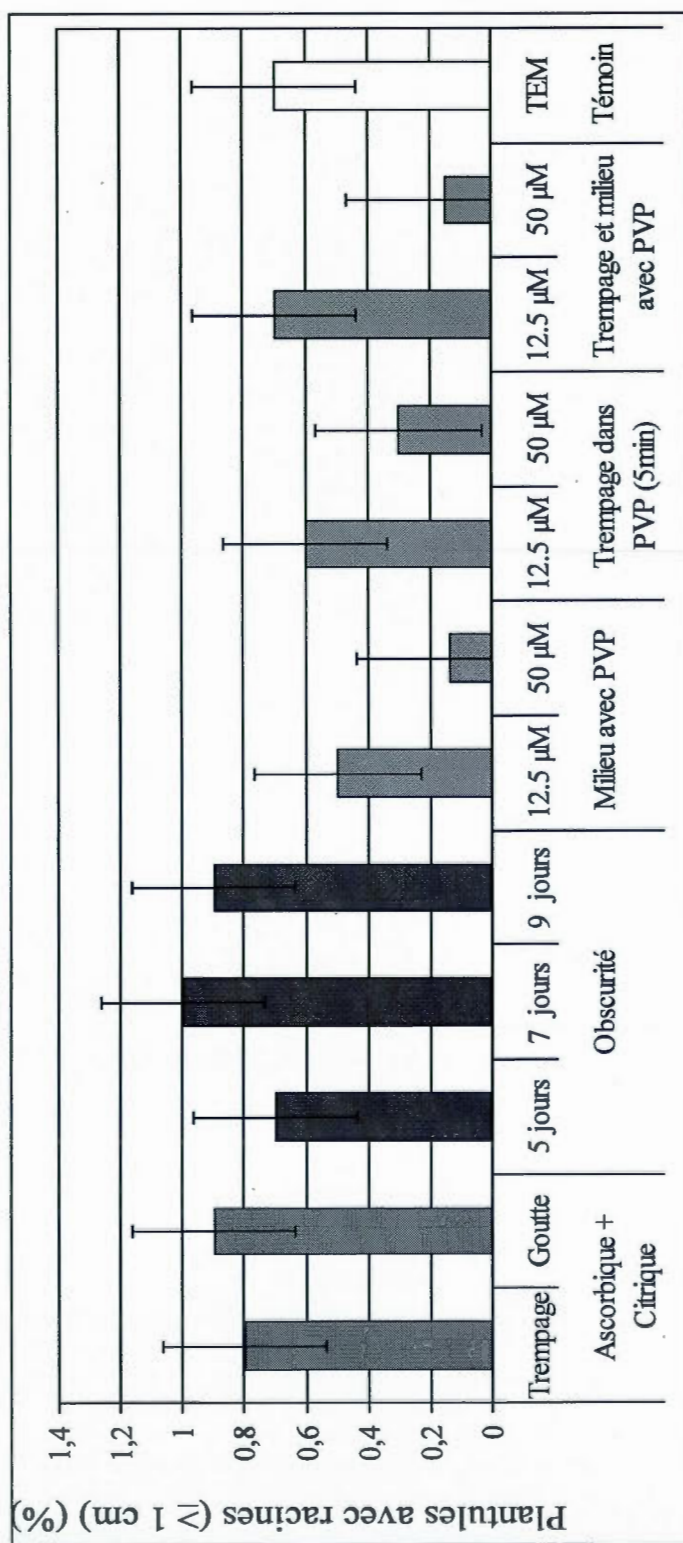


FIGURE 5.4 Pourcentage d'explantats ayant régénéré une plantule pourvue d'au moins une racine (≥ 1 cm), pour chacun des traitements (acide ascorbique et acide citrique, obscurité et PVP). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %. Cette figure a été produite à partir des données transformées ($\sqrt{}$).

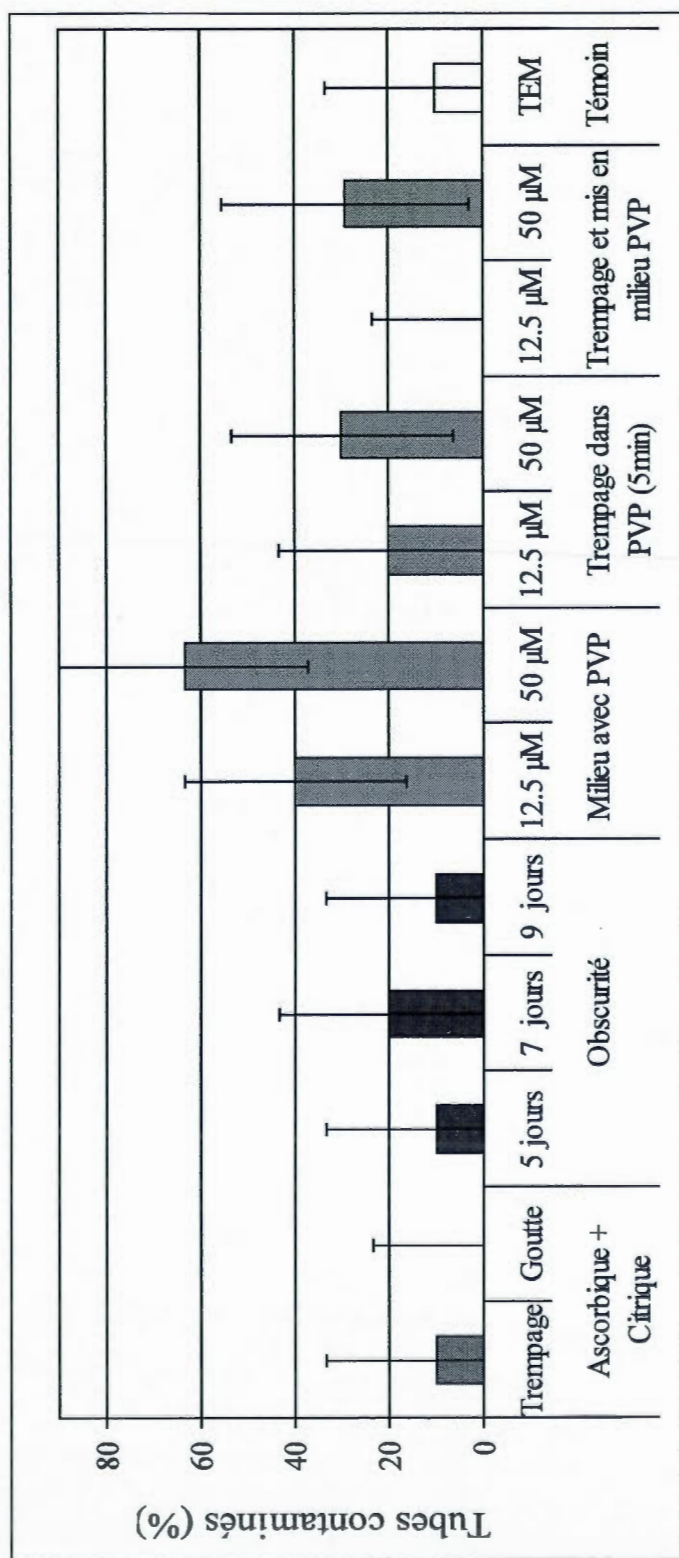


FIGURE 5.5 Pourcentage de tubes contaminés, pour chacun des traitements (acide ascorbique et acide citrique, obscurité et PVP). La barre indique l'intervalle de confiance à 95 %.



FIGURE 5.6 Différence de croissance entre une plantule sur milieu avec phénols oxydés (à gauche) et une plantule sur milieu sans phénols (à droite).

5.6 BIBLIOGRAPHIE

- Addinsoft 2007. XLSTAT software. Release 2007. New York, NY, Addinsoft U.S.A.
- Altunkaya A. et V. Gökmen. 2009. «Effect of various anti-browning agents on phenolic compounds profile of fresh lettuce (*L. sativa*)». *Food chemistry*, vol. 117, p. 122-126.
- Brassard N., C. Richer, D. Tousignant et J.A. Rioux. 2003. «Multiplication végétative de l'*Acer saccharum*: contribution à la micropropagation ». *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 33, p. 682-690.
- Buchanan B.B., W. Gruissem et R.L. Jones. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1367 p.
- Cuadra P., J.B. Harborne et P.G. Waterman. 1997. «Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation». *Phytochemistry*, vol. 45, no 7, p. 1377-1997.
- Kiong A.L.P., Y.S. Thing, J.A. Gansau et S. Hussein. 2008. «Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revoluta*». *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no 23, p. 4279-4284.
- Krishna H., R.K. Sairam, S.K. Singh, V.B. Patel, R.R. Sharma, M. Grover, L. Nain et A. Sachdev. 2008. «Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments». *Scientia Horticulturae*, vol. 118, p. 132-138.
- Mroginski L.A., S.M. Rouvier, J.C. Fabisik, M. Levit, M.A. Marassi, P.A. Sansberro et H.Y. Rey. 1999. «Effect of medium composition and light supply on *in vitro* shoot proliferation in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae)». *Journal of Plant Nutrition*, vol. 22, no 2, p. 359-368.
- Mulabagal V., M. Ngouajio, A. Nair, Y. Zhang, A.L. Gottumukkala et M.G. Nair. 2010. «*In vitro* evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties». *Food chemistry*, vol. 118, p. 300-306.
- Murashige T. et F. Skoog. 1962. «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures». *Plant Physiology*, vol. 15, p. 473-497.
- Pati S., I. Losoto, F. Palmisano et P.G. Zambonin. 2006. «Characterization of caffeic acid enzymatic oxidation by-products by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry». *Journal of Chromatography A*, vol. 1102, no 184-192, p. 184.
- Raven P.H., R.F. Evert et S.E. Eichhorn. 2000. *Biologie végétale*. Trad. de: *Biology of Plants*, sixth edition. Paris: De Boeck Université, 944 p.

Salisbury F.B. et C.W. Ross. 1992. *Plant Physiology* 4th ed. Coll. «Wadsworth Biology». Belmont, California: Wadsworth Publishing Company, 682 p.

SAS Institute Inc. 1999. *The SAS system for Windows*, Release 8.2. Cary, N.C.: SAS Institute

Sigma Bioscience 1996. *Plant Culture Catalogue: Products, Equipment and Technical Information*. Sigma-Aldrich. Sigma Chemical Company. Ontario: 88 p.

Taiz L. et E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*, 5th ed.: Sinauer & Associates, Incorporated, 700 p.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Dans le cadre d'un projet d'amélioration génétique de la laitue, nous avons tenté de trouver les bonnes pratiques de clonage *in vitro* adaptées à des explantats issus de bourgeons apicaux et axillaires, prélevés sur des cœurs de laitue (*Lactuca sativa* L.) récoltés au champ, qui permettront de maximiser le pourcentage d'explantats, issus du clonage, se régénérant en plantules viables. La variation somaclonale et la transmission de maladies virales restent et demeurent toujours des risques, que nous avons tenté de minimiser par nos pratiques culturales, telles que l'utilisation de la régénération directe et la destruction des génotypes suspects. Il faut quant même prendre en compte que d'autres types d'analyses seront nécessaires afin de confirmer que l'intégrité génétique a été préservée d'une génération à l'autre.

Les expériences ont mis en évidence qu'il faut prioriser les bourgeons apicaux, puisqu'ils se développent nettement mieux en plantules viables que les bourgeons axillaires qui sont aussi plus difficiles à décontaminer. Toutefois chaque cœur de laitue ne renfermant qu'un seul bourgeon apical, il est fortement recommandé de travailler simultanément avec les bourgeons axillaires afin de minimiser les pertes de génomes précieux.

L'aseptisation des explantats doit se faire en utilisant de l'hypochlorite de sodium (NaOCl) 1.2 % pendant 10 minutes, sous agitation continue. Après les rinçages, les tissus parenchymateux sous-jacents aux bourgeons doivent être taillés selon un plan de coupe de type diamant de 6 mm de long. Ceci doit se faire dans une goutte de solution antioxydante (0.02 g d'acide L-ascorbique, combiné à 0.03 g d'acide citrique anhydre), afin de minimiser l'oxydation des composés phénoliques pouvant causer le brunissement des tissus et du milieu de culture. Idéalement, les explantats seront maintenus jusqu'à l'acclimatation sur un milieu nutritif de base MS auquel on peut ajouter jusqu'à 7.48 μ M d'AIA. En suivant cette procédure il est possible d'obtenir un bon pourcentage de régénération en plantules viables à partir de bourgeons prélevés sur différents cultivars.

Plusieurs paramètres ont été couverts dans ce projet de recherche mais il en reste encore beaucoup à optimiser, si l'on veut parfaire le clonage *in vitro* de la laitue. Pour en citer quelques-uns, il serait très pertinent d'approfondir l'effet de la lumière car la qualité et la quantité de lumière reçue par l'explantat ont une incidence sur sa croissance et que certaines

plantules ont tendance à avoir des entrenœuds trop longs, ce qui n'est pas un aspect recherché chez la laitue. Il est possible que ce problème soit aussi lié au type de contenant qui est utilisé pour faire la culture *in vitro* de la laitue. Les éprouvettes ont peut-être un diamètre trop faible. Une autre raison pourrait être leur disposition dans la chambre de croissance qui est peut-être trop rapprochée au niveau des portoirs. Le type d'équipement utilisé pour fournir la lumière nécessite aussi une certaine attention, puisque dépendamment de la taille de la production elle constitue une importante source de chaleur dans un espace fermé. La température devient ainsi difficilement contrôlable en raison des écarts de température qui deviennent importants entre le jour et la nuit. L'effet de ces écarts de température sur la croissance, la régénération et surtout la floraison sont aussi des éléments à considérer. En effet la floraison est un autre élément qui nécessite une attention et qui est lié à la fois avec la température et la lumière. Cela constitue un problème en amélioration génétique de la laitue, dans la mesure où une floraison trop précoce peut considérablement réduire, voire même hypothéquer, la production de semences en raison d'une quantité trop importante de fleurs immatures.

BIBLIOGRAPHIE GÉNÉRALE

- Addinsoft 2007. XLSTAT software. Release 2007. New York, NY, Addinsoft U.S.A
- Alconero R. 1988. Lettuce (*Lactuca sativa* L.). In Bajaj YPS (ed) «Biotechnology in agriculture and forestry». Berlin Heidelberg New York Tokyo: Springer, vol 6. Crops II p 351-369.
- Altunkaya A. et V. Gökmen. 2009. «Effect of various anti-browning agents on phenolic compounds profile of fresh lettuce (*L. sativa*)». *Food chemistry*, vol. 117, p. 122-126.
- Ampomah-Dwamena C., J.A. Conner et G.A. Fautrier. 1997. «Genotypic response of lettuce cotyledons to regeneration in vitro». *Scientia Horticulturae*, vol. 71, p. 137-145.
- Arnaldos T.L., R. Munoz, M.A. Ferrer et A.A. Calderón. 2001. «Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) callus culture». *Physiologia Plantarum*, vol. 113, no 3, p. 315 - 322.
- Arnaldos T.L., R. Munoz, M.A. Ferrer et A.A. Claderon. 2008. «Changes in phenol content during strawberry (*Fragaria x ananassa*, cv. Chandler) Callus culture». *Physiologia Plantarum*, vol. 113, no 3, p. 315 - 322.
- Asghar S., T. Ahmad, I.A. Hafiz et M. Yaseen. 2011. «In vitro propagation of orchid (*Dendrobium nobile*) var. Emma white». *African Journal of Biotechnology*, vol. 10, no 16, p. 3097-3103.
- Avila S., M. Tony, Mederos et Adolfo (2005). Romain lettuce variety named Sunbelt. United States Patent. United States Patent. U.S.A, Central Valley Seeds. 6841723
- Bloksberg L.N. et M.E.J. Salveit. 1986. «Regeneration of plants from axillary buds of harvested and stored heads of field-grown Iceberg lettuce». *Hortscience*, vol. 21, no 5, p. 1201-1203.
- Brassard N., C. Richer, D. Tousignant et J.A. Rioux. 2003. «Multiplication végétative de l'*Acer saccharum*: contribution à la micropropagation ». *Canadian Journal of Forest Research*, vol. 33, p. 682-690.
- Brown C., J.A. Lucas, I.R. Crute, G.A. Walkey et J.B. Power. 1986. «An assessment of genetic variability in somacloned lettuce plants (*Lactuca sativa*) and their offspring». *Annals of Applied Biology* vol. 109, p. 391- 407.
- Buchanan B.B., W. Gruissem et R.L. Jones. 2000. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1367 p

- Cerioni L., V.A. Rapisarda, M. Hilal, F.E. Prado et L. Rodriguez-Montelongo. 2009. «Synergistic antifungal activity of sodium hypochlorite, hydrogen peroxide, and cupric sulfate against *Penicillium digitatum*». *Journal of Food Protection*, vol. 72, no 8, p. 1660-1665.
- Cline M.G. 1994. «The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development». *Physiologia Plantarum*, vol. 90, p. 230-237.
- Cuadra P., J.B. Harborne et P.G. Waterman. 1997. «Increases in surface flavonols and photosynthetic pigments in *Gnaphalium luteo-album* in response to UV-B radiation». *Phytochemistry*, vol. 45, no 7, p. 1377-1997.
- Delassandro G. et L.W. Roberts. 1971. «Introduction of xylogenesis in pith parenchyma explants of *Lactuca*». *American Journal of Botany*, vol. 58, no 5, p. 378-385.
- de Vries I.M. 1997. «Origin and domestication of *Lactuca sativa* L.». *Genetic Resources and Crop Evolution*, vol. 44, p. 165-174.
- Dodds J.H. et L.W. Roberts. 1982. *Experiments in Plant Tissue Culture*. Cambridge: Cambridge University, 178 p.
- Doerschug M.R. et C.O. Miller. 1967. «Chemical Control of Adventitious Organ Formation in *Lactuca sativa* Explants». *American Journal of Botany*, vol. 54, no 4 (april), p. 410-413.
- Dupont S.M., Z. Mondin, G. Williamson et K.R. Price. 2000. «Effect of variety, processing and storage on the flavonoid glycoside content and composition of lettuce and endive». *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 48, p. 3957-3964.
- Garcia-Luis A., R.V. Molina, V. Varona, S. Castello et J.L. Guardiola. 2006. «The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration *in vitro* in epicotyl cuttings of Troyer citrange». *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, vol. 85, p. 137 - 144.
- Georges E.F. 1993. *Plant Propagation by Tissue Culture Part: 1 The Technology*. England: Exegetics Ltd, 573 p.
- Hunter D.C. et D.J. Buritt. 2002. «Improved adventitious shoot production from cotyledon explants of lettuce (*Lactuca sativa* L.)». *Scientia Horticulturae*, vol. 95, p. 269-276.
- Husen A. et M. Pal. 2007. «Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. F. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment». *New Forest*, vol. 33, p. 309-323.
- Jenni S. et G.C. Emery. 2008. «Hochelaga lettuce». *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 88, no 1, p. 551-553.

- Jenni S. et G.C. Emery. 2009. «Estival lettuce». *Canadian Journal of Plant Science*, vol. 89, no 1, p. 99-101.
- Jenni S., F. Loukili et B.E. Moghaddam. 2006. «*In vitro* culture response of apical and axillary shoot-tips excised from crisphead lettuce cores depends on head maturity, not storage time». *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, vol. 42, no May-June, p. 274-277.
- Kadkade P.G. et M. Seibert. 1977. «Phytochrome-regulated organogenesis in lettuce tissue culture». *Nature*, vol. 270, no London, p. 49-50.
- Kanamoto H., A. Yamashita, H. Asao, S. Okumura, H. Takase, M. Hattori, A. Yokota et K.-I. Tomizawa. 2006. «efficient and stable transforamtion of *Lactuca sativa* L. cv. Cisco (lettuce) plastids». *Transgenic Research*, vol. 15, p. 205-217.
- Kim I., E. Cho, K. Crawford, F.D. Hempel et P.C. Zambryski. 2005. «Cell-to-cell movement of GFP during embryogenesis and early seedling development in *Arabidopsis*». *The National Academy of Sciences of the USA*, vol. 102, no 6, p. 2227-2231.
- Kim J.-Y., Z. Yuan et D. Jackson. 2003. «Developmental regulation and significance of KNOX protein trafficking in *Arabidopsis*». *Development*, vol. 130, p. 4351-4362.
- Kim J.H. et J.R. Botella. 2004. «Etr1-1 gene expression alters regeneration patterns in transgenic lettuce stimulating root formation ». *Plant Cell , Tissu and Organ Culture*, vol. 78, p. 69-73.
- Kiong A.L.P., Y.S. Thing, J.A. Gansau et S. Hussein. 2008. «Induction and multiplication of callus from endosperm of *Cycas revoluta*». *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no 23, p. 4279-4284.
- Koevary K., L. Rappaport et L.L. Morris. 1978. «Tissue culture propagation of head lettuce.». *Hortscience*, vol. 13, no 1, p. 39-41.
- Krishna H., R.K. Sairam, S.K. Singh, V.B. Patel, R.R. Sharma, M. Grover, L. Nain et A. Sachdev. 2008. «Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments». *Scientia Horticulturae*, vol. 118, p. 132-138.
- Kroon P.A. et W. Gary. 1999. «Hydroxycinnamates in plants and food:current and future perspectives». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 79, p. 355-361.
- Kyte L. 1987. *Plants From Test Tubes: An Introduction to Micropropagation Revised*. Portland, Oregon Timber Press Inc., 160 p.
- Laurence C.C. et L.O. Robyn. 2005. «Changes in macromolecular movement accompany organogenesis in thin cell layers of *Torenia fournieri*». *Planta*, vol. 222, p. 933-946.

- Maina S.M., Q. Emongor, K.K. Sharma, S.T. Gichuki, M. Gathaara et S.M. de Villiers. 2010. «Surface sterilant effect on the regeneration efficiency from cotyledon explants of groundnut (*Arachis hypogea* L.) varieties adapted to eastern and Southern Africa». *African Journal of Biotechnology*, vol. 9, no 20, p. 2866-2871.
- Mohebodini M., M.J. Javaran, F. Mahboudi et H. Alizadeh. 2011. «Effects of genotype, explant age and growth regulators on callus induction and direct shoot regeneration of Lettuce (*Lactuca sativa* L.)». *Australian Journal of Crop Science*, vol. 5, no 1, p. 92-95.
- Mezzetti B., G. Savini, F. Carnevali et D. Mott. 1997. «Plant genotype and growth regulators interaction affecting *in vitro* morphogenesis of blackberry and raspberry». *Biologia Plantarum*, vol. 39, no 1, p. 139-150.
- Morin M. et L. Shinder (2008). Les industries des cultures de serres, des gazonnières et des pépinières. Statistique Canada. Ottawa
- Mroginski L.A., S.M. Rouvier, J.C. Fabisik, M. Levit, M.A. Marassi, P.A. Sansberro et H.Y. Rey. 1999. «Effect of medium composition and light supply on *In vitro* shoot proliferation in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae)». *Journal of Plant Nutrition*, vol. 22, no 2, p. 359-368.
- Mulabagal V., M. Ngouajio, A. Nair, Y. Zhang, A.L. Gottumukkala et M.G. Nair. 2010. «*In vitro* evaluation of red and green lettuce (*Lactuca sativa*) for functional food properties». *Food chemistry*, vol. 118, p. 300-306.
- Müller D. et O. Leyser. 2011. «Auxin, cytokinin and the control of shoot branching». *Annals of Botany*, vol. 107, p. 1203-1212.
- Murashige T. et F. Skoog. 1962. «A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures». *Plant Physiology*, vol. 15, p. 473-497.
- Naz S., A. Ali et J. Iqbal. 2008. «Phenolic content *in vitro* cultures of chick pea (*Cicer arietinum* L.) during callogenesis and organogenesis». *Pakistan Journal of Botany*, vol. 40, no 6, p. 2525-2539.
- Nhut T.D., T.T.A. Trunong, T.D.H. Nguyen, T.D. Nguyen, Q.T. Nguyen et H.V. Nguyen. 2007. «Effect of genotype, explant size, position, and culture medium on shoot generation of *Gerbera jamesonii* by receptacle transverses thin cell layer culture». *Scientia Horticulturae*, vol. 111, p. 146- 151.
- Nicolle C., A. Carnat, D. Fraisse, J.-L. Lamaison, E. Rock, H. Michel, P. Amouroux et C. Remesy. 2004. «Characterisation and variation of antioxidant micronutrients in lettuce (*Lactuca sativa* folium)». *Journal of the Science of Food and Agriculture*, vol. 84, p. 2061-2069.

- Ozyigit I.I. 2008. «Phenolic changes during *in vitro* organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips». *African Journal of Biotechnology*, vol. 7, no 8, p. 1145-1150.
- Ozyigit I.I., M.V. Kahraman et O. Ercan. 2007. «Relation between explant age, total phenols and regeneration response in tissue cultured cotton (*Gossypium hirsutum* L.)». *African Journal of Biotechnology*, vol. 6, no 1, p. 003-008.
- Palanisamy K. et P. Kumar. 1997. «Effect of position, size of cuttings and environmental factors on adventitious rooting in neem (*Azadirachta indica* A.Juss)». *Forest Ecology and Management*, vol. 98, p. 277-280.
- Pati S., I. Losoto, F. Palmisano et P.G. Zambonin. 2006. «Characterization of caffeic acid enzymatic oxidation by-products by liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry». *Journal of Chromatography A*, vol. 1102, no 184-192, p. 184.
- Peres L.E.P., N. Majerowicz et G.B. Kerbaux. 2001. «Dry matter partitioning differences between shoots and roots in two contrasting genotypes of orchids and their relationship with endogenous levels of auxins, cytokinins and abscisic acid». *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, vol. 13, no 2, p. 185-195.
- Pierik R.L.M. 1987. *In Vitro Culture of Higher Plants*. Dordrecht, Netherlands: Martinus Nijhoff Publishers, 344 p.
- Pink D.A.C. 1991. «Micropropagation of lettuce (*Lactuca sativa* L.)». *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 19, p. 42 - 57.
- Pink D.A.C. 1992. *Micropropagation of lettuce (Lactuca sativa L.)*. Coll. «Biotechnology in Agriculture and Forestry», no High-Tech and Micropropagation III. Verlag Berlin Heidelberg: Springer, 42 - 57 p.
- Pink D.A.C. et P.J. Carter. 1987. «Propagation of lettuce (*Lactuca sativa*) breeding material by tissue culture». *Annals of Applied Biology* vol. 110, no 3, p. 611- 616.
- Raven P.H., R.F. Evert et S.E. Eichhorn. 2000. *Biologie végétale*. Trad. de: Biology of Plants, sixth edition. Paris: De Boeck Université, 944 p.
- Reinhardt D., T. Mandel et C. Kuhlemeier. 2000. «Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs». *The Plant Cell*, vol. 12, p. 507-518.
- Rinne P., A. Saarelainen et O. Junttila. 1994. «Growth cessation and bud dormancy in relation to ABA level in seedlings and coppice shoot of *Betula pubescens* as affected by a short photoperiod, water stress and chilling». *Physiologia Plantarum*, vol. 90, p. 451-458.

- Roussos P.A., A. Matsoukis, C.A. Pontikis et A. Chronopoulou-Sereli. 2007. «Relations of environmental factors with the phenol content and oxidative enzyme activities of olive explants». *Scientia Horticulturae*, vol. 113, p. 100-102.
- Ryder E.J. (1999). Lettuce, endive and chicory. Crop production science in horticulture. Jeff Atherton, et al. California, US Department of agriculture. 9
- Salisbury F.B. et C.W. Ross. 1992. *Plant Physiology* 4th ed. Coll. «Wadsworth Biology». Belmont, California: Wadsworth Publishing Company, 682 p.
- SAS Institute Inc. 1999. *The SAS system for Windows*, Release 8.2. Cary, N.C.: SAS Institute
- Stafford A. et G. Warren. 1991. *Plant Cell and Tissue Culture*. Institute of Biology. Milton Keynes, UK: Open University Press 251p.
- Sigma Bioscience 1996. Plant Culture Catalogue: Products, Equipment and Technical Information. Sigma-Aldrich. Sigman Chemical Company. Ontario: 88 p
- Taiz L. et E. Zeiger. 2010. *Plant Physiology*, 5th ed.: Sinauer & Associates, Incorporated, 700 p.
- Tang W. et R. Newton. 2004. «Increase of polyphenol oxidase and decrease of polyamines correlate with tissue browning in Virginia pine (*Pinus virginiana* Mill)». *Elsevier*, vol. 167, p. 621-628.
- Teixeira da Silva J.A. 2003. «Thin cell layer technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology». *African Journal of Biotechnology*, vol. 2, no 12, p. 683 - 691.
- Teng W.-L., Y.-J. Liu et T.-S. Soong. 1992. «Rapid regeneration of lettuce from suspension culture». *HortScience*, vol. 27, no 9, p. 1030- 1032.
- Thicoïpé J.P. 1997. *Laitues*, Centre technique interprofessionnel des fruits et légumes. Paris: p.
- Tisserat B. et R. Silman. 2000. «Interactions of culture vessels, media volume, culture density, and carbon dioxide levels on lettuce and spearmint shoot growth in vitro». *Plant Cell Reports* vol. 19, p. 464-471
- Warren Wilson J., W.M.S. Keys, P.M. Warren Wilson et L.W. Roberts. 1994. «Effects of auxin on the spatial distribution of cell division and xylogenesis in lettuce pith explants». *Protoplasma*, vol. 183, p. 162-181.
- Webb D.T., L.D. Torres et P. Fobert. 1984. «Interaction of growth regulators, explant age, and culture environment controlling organogenesis from lettuce cotyledons *in vitro*». *Canadian Journal of Botany*, vol. 62, p. 586-590.

- Wehner T.C. 2002. «Vegetable cultivar descriptions for North America. List 26». *Hortscience*, vol. 37, p. 15-78.
- Yildiz M. et C. Er. 2002. «The effect of sodium hypochlorite solutions on *in vitro* seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*)». *Naturwissenschaften*, vol. 89, p. 259-261.
- Zaffari G.R., G.B. Kerbaui, J.E. Kraus et E.C. Romano. 2000. «Hormonal and histological studies related to *in vitro* banana bud formation». *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, vol. 63, p. 187-192.
- Zenk M.H. et G. Müller. 1964. «Über den Einfluss der Wundflächen auf die enzymatische oxydation der Indol-3-essigsäure *in vivo*». *Planta*, vol. 61, p. 346-351.
- Zulfiqar B., N.A. Abbasi, T. Ahmad et I.A. Hafiz. 2009. «Effect of explant sources and different concentrations of plant growth regulators on *in vitro* shoot proliferation and rooting of avocado (*Persea americana* Mill.) cv. Fuerte». *Pakistan Journal of Botany*, vol. 41, no 5, p. 2333-2346.

APPENDICE A

ILLUSTRATION DES DIFFÉRENTES VOIES DE DÉVELOPPEMENT QUE PEUVENT
PRENDRE LES EXPLANTATS